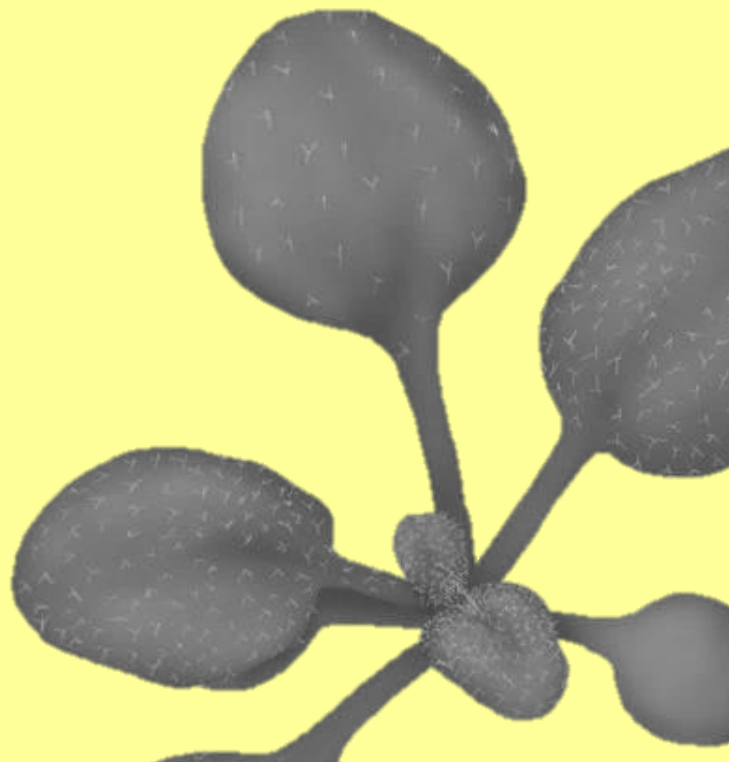


Tesis Doctoral

Señalización intracelular mediada por el sulfuro en *Arabidopsis thaliana*

Ana M^a Laureano Marín
Sevilla 2016





Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

CSIC-Universidad de Sevilla

**Señalización intracelular mediada por el sulfuro en
*Arabidopsis thaliana***

Trabajo realizado para optar al grado de Doctora por la Licenciada

Ana M^a Laureano Marín

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Cecilia Gotor Martínez
Investigadora científica CSIC

Dr. Luis C. Romero González
Investigador científico CSIC

TUTOR DE TESIS

Dr. Agustín Vioque Peña
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Índice	i
Abreviaturas	iii
Resumen	1
Introducción	5
1. El azufre en las plantas	7
1.1. Asimilación fotosintética del azufre	8
• Transporte	8
• Activación	9
• Reducción	10
1.2. Biosíntesis de cisteína	10
1.3. DES1: una nueva L-cisteína desulfhidrasa	14
2. El sulfuro de hidrógeno	19
2.1. Definición y propiedades físico-químicas	19
2.2. El H ₂ S como molécula señal	20
2.2.1. Producción y catabolismo del H ₂ S	20
• Mamíferos	20
• Plantas	22
2.3. Mecanismos de acción del sulfuro	24
2.3.1. El H ₂ S como antioxidante	24
2.3.2. S-sulfhidratación de proteínas	25
2.4. Funciones fisiológicas del H ₂ S	28
2.4.1. Mamíferos	28
2.4.2. Plantas	29
• Metales pesados y otros estreses iónicos	29
• Estrés salino	30
• Sequía	30
• Estrés por calor	31
• Estreses bióticos	31
• Germinación	32
• Movimiento estomático	32
• Fotosíntesis	33
• Organogénesis y elongación de la raíz	33
• Senescencia y post-cosecha	33
• Autofagia	34
3. Autofagia en plantas	34
3.1. Maquinaria molecular de la autofagia	36
• Iniciación	37
• Nucleación	37
• Expansión del fagóforo y cierre del autofagosoma	38

• Transporte y fusión con la vacuola	41
• Degradación del contenido y reciclaje	41
3.2. Regulación de la autofagia	41
3.2.1.Regulación por la vía TOR	42
3.2.2.Regulación redox	43
3.2.3.Regulación por modificaciones post-traduccionales.....	45
3.3. Funciones fisiológicas de la autofagia en plantas	47
3.4. Estudio de la autofagia en plantas	49
3.4.1.Detección de GFP-ATG8 por microscopía.....	49
3.4.2.Métodos bioquímicos.....	50
Objetivos.....	53
Capítulo I: Análisis de la regulación transcripcional de la proteína DES1, responsable de la generación de sulfuro en el citosol.....	57
Capítulo II: La regulación negativa de la autofagia por el sulfuro es independiente de las especies reactivas del oxígeno	71
Anexo: La S-sulfhidratación de la proteína ATG4a regula la autofagia en <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
Discusión.....	137
Conclusiones.....	151
Bibliografía.....	155

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ABC	Casete de unión a ATP
AIM	Motivo de interacción con ATG8
AMPK	Proteína quinasa activada por 5'-AMP
AOA	Ácido aminooxiacético
APS	Adenosin-5'-fosfosulfato
APX	Ascorbato peroxidasa
ATP	Adenosin-5'-trifosfato
CAS-C1	β -Cianoalanina sintasa
CAT	Cisteína aminotransferasa
CBS	Cistationina β -sintasa
CoA	Coenzima A
ConA	Concanamicina A
cPTIO	2-4-carboxifenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
CSE	Cistationina γ -liasa
CuZn SOD	Superóxido dismutasa de cobre-zinc
D-CDES	D-cisteína desulfhidrasa
DES1	L-cisteína desulfhidrasa 1
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
DTT	Ditiotreitol
GABARAP/	Proteína asociada al receptor de GABA/
GATE	potenciador de la ATPasa asociada al Golgi
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína fluorescente verde
GPX	Guaiacol peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GS	Glutamina sintetasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GSSH	Glutación persulfuro
GST	Glutación S-transferasa
HR	Respuesta hipersensible
IAA	Ácido indolacético
LC3	Cadena ligera 3
L-CDES	L-cisteína desulfhidrasa
MBSM	Método modificado del "Biotin Switch"
MDA	Malondialdehído
MPT	Modificación post-traducciona
MSBT	Metilsulfonil benzotiazol
3-MST	3-Mercapto piruvato sulfurtransferasa
MV	Metilviológeno
OAS	O-Acetilserina
OASTL	O-Acetilserina(tiol)liasa
PAPS	3'-Fosfoadenosina-5'-fosfosulfato
PAS	Estructura pre-autofágica

Abreviaturas

PCD	Muerte celular programada
PE	Fosfatidiletanolamina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PKA	Proteína quinasa A
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
PPi	Pirofosfato inorgánico
PTP1B	Tirosín fosfatasa 1B
RCB	“RuBisCO containing bodies”
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RuBisCO	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SAT	Serina acetiltransferasa
SAV	Vacuola asociada a senescencia
SCS	Sulfocisteína sintasa
SED	Defensa potenciada por azufre
SiR	Sulfato reductasa
SIR	Resistencia inducida por azufre
SOD	Superóxido dismutasa
TOR	“Target of rapamycin”
γ-ECS	γ -Glutamilcisteína sintetasa

Resumen

En los últimos años el concepto que se tenía del sulfuro de hidrógeno (H_2S) ha cambiado drásticamente, ya que ha pasado de ser considerado una sustancia tóxica a ser reconocido como una molécula señalizadora de importancia comparable al NO y el CO en mamíferos. En los sistemas vegetales, numerosos estudios han demostrado recientemente que el H_2S incrementa la tolerancia frente a diferentes condiciones de estrés y participa en la regulación de procesos esenciales para las plantas como la fotosíntesis, el movimiento estomático y la autofagia.

En el citosol de *Arabidopsis thaliana* la producción endógena de H_2S es llevada a cabo por la enzima L-cisteína desulfhidrasa, DES1, que cataliza la desulfuración de la L-cisteína hasta sulfuro, amonio y piruvato. Para definir el papel funcional que desempeñan la proteína DES1 y la molécula de H_2S en la regulación de determinados procesos fisiológicos en las plantas, se ha estudiado la expresión de este gen durante el desarrollo de la planta y a nivel tisular. Para ello, se han generado plantas transgénicas que expresan el gen reportero *GFP* bajo el control del promotor de *DES1*. Los datos obtenidos revelan que *DES1* se expresa en todas las etapas del desarrollo de la planta, aunque dicha expresión es mayor en los estadios tempranos (plántula) y en la madurez. La expresión es además muy ubicua, ya que la fluorescencia de la GFP se observa en el citosol de las células de la epidermis y del mesófilo, así como en el de las células guarda y es muy abundante en los hidátodos y en los tricomas. En las plantas maduras, la señal de la GFP se detecta en los tejidos florales y en las silicuas.

La localización de la expresión de GFP, junto con la identificación de elementos reguladores dentro del promotor de *DES1*, apuntan a una regulación hormonal de dicho gen. Recientemente se ha demostrado que el ABA induce la expresión de *DES1* y en el presente trabajo hemos determinado que el tratamiento *in vitro* con auxinas reprime de forma significativa la expresión de *DES1*.

En el segundo capítulo de esta Tesis se ha estudiado el papel del H_2S como regulador negativo de la autofagia. Mediante la visualización al microscopio confocal de plantas transgénicas que expresan la proteína de fusión GFP-ATG8 y el análisis por western-blot de la acumulación y lipidación de la proteína ATG8, hemos demostrado que el H_2S (y no otras moléculas que contienen azufre o el propio amonio) es capaz de inhibir la autofagia inducida por privación de nitrógeno en raíces de *Arabidopsis thaliana*. Además, hemos determinado que el mecanismo por el cual se produce la represión de la autofagia por parte del H_2S en *Arabidopsis* no está relacionado con su función antioxidante, ya que las especies reactivas del oxígeno producidas por la carencia de nitrógeno no son eliminadas por la presencia de H_2S pero sí por la de compuestos antioxidantes. Sin embargo, la adición de compuestos antioxidantes no disminuye la inducción de la autofagia producida en nuestras condiciones experimentales, como ocurre con el H_2S . Por lo que concluimos que el H_2S reprime la autofagia a través de un mecanismo que es independiente de las condiciones redox.

En el tercer capítulo de esta Tesis se ha profundizado en el estudio del mecanismo de regulación de la autofagia por parte del H₂S. En base a las propiedades químicas que presenta la molécula de sulfuro, otro de los mecanismos de acción propuestos, además de su posible función antioxidante, es la modificación de los residuos tiólicos de las proteínas mediante S-sulfhidratación. Hemos realizado una búsqueda de proteínas ATG que presenten residuos de cisteína en sus secuencias y por tanto puedan ser dianas de este tipo de regulación y junto con lo descrito en la literatura, hemos propuesto a ATG4 como una posible diana de regulación. Mediante la realización de la técnica denominada “Tag-Switch” para la detección de proteínas sulfhidratadas, hemos demostrado que AtATG4a es una diana específica de S-sulfhidratación. Además, utilizando un ensayo reconstituido que incluye la proteína ATG8 de *C. reinhardtii* y la proteína AtATG4a hemos llevado a cabo ensayos de actividad proteolítica ATG4 *in vitro*. Nuestros datos nos permiten sugerir que la S-sulfhidratación produce una inhibición de la actividad de ATG4, lo que concuerda con nuestros resultados obtenidos *in vivo* que muestran que el sulfuro actúa inhibiendo el proceso autofágico.

Introducción

1. El azufre en las plantas

El azufre es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas que constituye entre el 0,3% - 0,5% del total del peso seco. La forma más abundante de azufre en la naturaleza se encuentra en forma de sulfato y éste es incorporado por las plantas, reducido y asimilado para formar cisteína en el proceso de asimilación fotosintética de sulfato. La cisteína es, por tanto, el primer compuesto orgánico con azufre reducido sintetizado por la planta (Takahashi et al., 2011). La importancia de la cisteína en las plantas radica no solo en su papel como aminoácido proteinogénico, sino también por su función como precursor de un gran número de biomoléculas esenciales y compuestos de defensa formados en las plantas en respuesta a condiciones adversas (Romero et al., 2014). El grupo tiol de la cisteína puede ser oxidado, dando lugar a la formación de puentes disulfuro entre dos residuos de cisteína. Los puentes disulfuro son determinantes en el plegamiento de las proteínas, lo que a su vez repercute en su estabilidad y su función (Haag et al., 2012). Además, algunas proteínas pueden sufrir óxido/reducción reversible de estos puentes disulfuro como mecanismo de regulación redox de sus funciones (Buchanan y Balmer, 2005). Los grupos tiólicos de las cisteínas, localizados a menudo en sus sitios activos, son esenciales para la catálisis en muchas reacciones enzimáticas.

Entre las biomoléculas derivadas de la cisteína se encuentran el otro aminoácido azufrado metionina, vitaminas como la biotina y la tiamina, cofactores como el coenzima A y las agrupaciones sulfo-férricas. Hay que destacar por su relevancia a la molécula de glutatión (GSH) que posee propiedades antioxidantes. El tripéptido γ -glutamyl-cisteinil-glicina es considerado el principal determinante de la homeostasis redox en la célula (Foyer y Noctor, 2011; Noctor et al., 2012). Esta propiedad del GSH se basa en la regulación redox del residuo tiólico presente en la cisteína que contiene. Del mismo modo, otras funciones del GSH, como su papel en la respuesta de la planta a condiciones ambientales desfavorables, pueden ser también atribuidas a la reactividad del grupo tiol. El GSH es el precursor de las fitoquelatinas, que intervienen en la destoxificación de los metales pesados (Mendoza-Cozatl et al., 2011; Rea, 2012) y además forma conjugados por la acción de la enzima glutatión S-transferasa (GST) con compuestos xenobióticos (Dixon et al., 2002). Otros compuestos como los glucosinolatos y la camalexina son importantes en la respuesta de las plantas frente a los patógenos. Los glucosinolatos son derivados de aminoácidos que contienen al menos dos átomos de azufre por molécula y son transformados en diferentes compuestos volátiles tóxicos para el patógeno. La camalexina por su parte, es un derivado azufrado del triptófano, tóxica para varias especies de hongos y bacterias (Kliebenstein, 2004; Bednarek et al., 2009). En todas estas biomoléculas, los residuos azufrados que intervienen como grupos funcionales, derivan de la cisteína. Otro metabolito estrechamente relacionado con la cisteína es el etileno, implicado en numerosos

procesos que tienen lugar a lo largo del ciclo de vida de la planta. El etileno está involucrado en la germinación de las semillas, el desarrollo de los pelos radicales, la abscisión de las hojas y pétalos, la maduración de los frutos, la senescencia de los órganos y la modulación de la respuesta a estrés (Bleecker y Kende, 2000).

Es por todo ello que la cisteína ocupa una posición central en el metabolismo primario y secundario de la planta.

1.1. Asimilación fotosintética del sulfato

En el proceso de asimilación fotosintética del sulfato se pueden diferenciar cuatro etapas fundamentales: transporte del sulfato hasta el interior celular, activación del sulfato, reducción del sulfato activado hasta sulfuro y biosíntesis de cisteína que comprende la incorporación del azufre reducido a esqueletos carbonados (Figura 1).

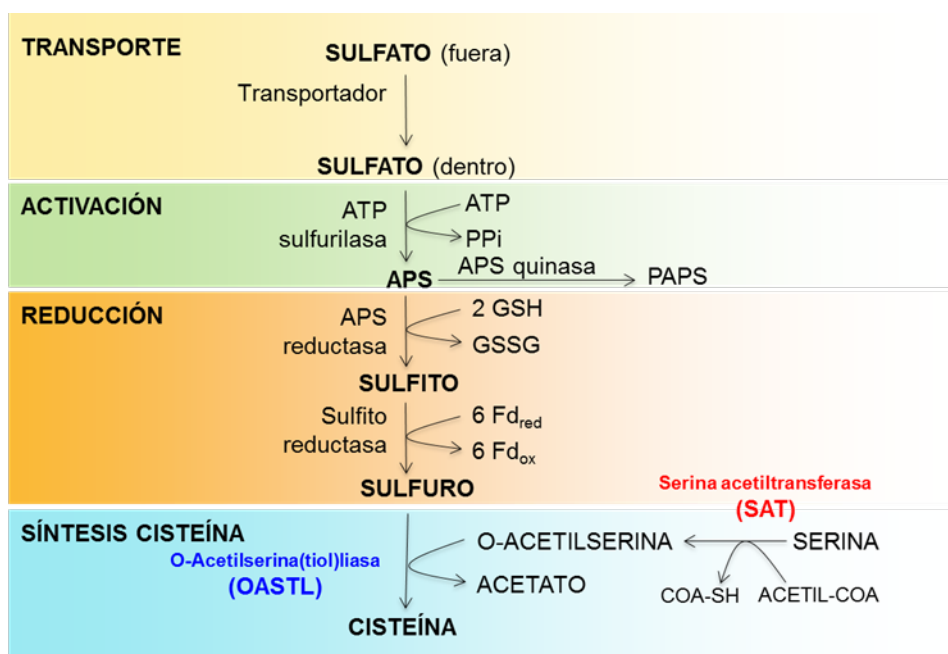


Figura 1: Ruta de asimilación fotosintética de sulfato y biosíntesis de cisteína en plantas.

- **Transporte**

El sulfato presente en el suelo es incorporado a través de las raíces y distribuido por el xilema al resto de la planta. El sulfato es transportado activamente al interior de las células de la raíz mediante un sistema de co-transporte que introduce un sulfato por cada tres protones ($3\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}$). Este sistema de co-transporte necesita de la existencia previa de un gradiente de protones en la célula, que es establecido mediante la acción de una H^+ -ATPasa.

Los transportadores de sulfato son una familia de proteínas transmembrana que se diferencian según su localización y su afinidad por el sulfato. *Arabidopsis thaliana* posee 12 genes *SULTR* que pueden dividirse en cuatro grupos diferentes. Los miembros del grupo *SULTR1* son los denominados transportadores de alta afinidad. Dentro de este grupo, *SULTR1;1* y *SULTR1;2* se localizan en las raíces y son responsables de la incorporación del sulfato desde el exterior al interior de la planta y se inducen en condiciones de deficiencia de azufre (Takahashi et al., 2000; Yoshimoto et al., 2002). *SULTR 1;3*, por su parte, se localiza en el floema y participa en la redistribución de sulfato desde los tejidos fuente a los sumideros (Yoshimoto et al., 2003).

Los transportadores del grupo 2 (*SULTR2;1* y *SULTR2;2*) son los denominados de baja afinidad y participan en el transporte a larga distancia (Takahashi, 2010).

El primer transportador caracterizado dentro del tercer grupo fue *SULTR3;5* que modula la función de *SULTR2;1* pero que no actúa como un transportador *per-se* (Kataoka et al., 2004). Los otros miembros de este grupo se encargan de internalizar el sulfato dentro de los plastidios donde tiene lugar la reducción hasta sulfuro (Cao et al., 2013).

Por último, los transportadores del grupo 4 se localizan en el tonoplasto y facilitan la salida de sulfato almacenado en la vacuola para suplir las necesidades de azufre de la planta (Kataoka et al., 2004).

El transporte de sulfato al interior de las células es considerado el paso más regulado de la ruta de asimilación de azufre en la planta (Vauclare et al., 2002) fundamentalmente a nivel transcripcional (Davidian y Kopriva, 2010).

• Activación

Una vez el sulfato ha entrado en la planta, puede ser almacenado en raíces u hojas en el interior de las vacuolas o ser utilizado en el proceso de asimilación (Bolchi et al., 1999). El sulfato tiene que ser reducido hasta sulfito, pero el potencial de óxido-reducción del par redox sulfato/sulfito a pH 7,0 es extraordinariamente negativo, $E'_0[\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}] = -516 \text{ mV}$. Al no existir donadores fisiológicos de electrones con potenciales redox tan negativos, la reducción directa del sulfato no es posible, por lo que, el sulfato inorgánico tiene que ser previamente activado.

Las ATP sulfurilasas (EC 2.7.7.4) catalizan la activación del sulfato hidrolizando la unión entre los fosfatos alfa y beta del ATP y añadiendo sulfato al fosfato alfa. La energía almacenada en el enlace anhidro fosfato-sulfato del producto de la reacción, adenosín 5'-fosfosulfato (APS), permite la reducción posterior del sulfato (Figura 1). Existen 4 genes que codifican distintas isoenzimas ATP sulfurilasas en *Arabidopsis*, de las cuales tres están localizadas en plastidios y una en el citosol (Hatzfeld et al., 2000; Mugford et al., 2011). La reacción de adenilación del sulfato está desplazada hacia la formación de ATP, por ello los productos de la reacción, APS y

pirofosfato (PPi), deben ser mantenidos a baja concentración por las enzimas pirofosfatasas, APS reductasas y APS quinasas. Estas últimas metabolizan el APS, catalizando la fosforilación dependiente de ATP del APS en la posición 3' dando lugar a 3'-fosfo adenosina-5'-fosfosulfato (PAPS). PAPS es la forma activa del sulfato usada para la síntesis de compuestos secundarios sulfatados en plantas. La presencia de actividad ATP sulfurilasa y APS quinasa en el citosol está ligada a la síntesis de PAPS, que es sustrato de sulfotransferasas que catalizan sulfataciones, donando grupos sulfatos a otros metabolitos como sulfolípidos y glucosinolatos. Todas estas enzimas sulfotransferasas que catalizan estas reacciones se encuentran en el citosol (Rotte y Leustek, 2000; Wittstock y Halkier, 2002; Mugford et al., 2011).

- **Reducción**

En los plastidios de hojas y raíces, en una primera reacción, el residuo de sulfato del APS es reducido hasta sulfito por la APS reductasa (EC 1.8.99.2) y en una segunda reacción el sulfito es reducido hasta sulfuro por la sulfito reductasa (SiR) (EC 1.8.7.1) (Figura 1).

Arabidopsis contiene tres genes que codifican APS reductasas. Estas enzimas poseen un dominio reductasa en su extremo N-terminal y un dominio C-terminal con actividad análoga a las tiorredoxinas y glutarredoxinas que interacciona con el donador de electrones que es glutatión reducido (Gutierrez-Marcos et al., 1996). Además del transporte de sulfato, el paso de la ruta más regulado es el llevado a cabo por las APS reductasas. Las APS reductasas se regulan por el estado nutricional de azufre en las plantas, puesto que se inducen en condiciones de deficiencia de azufre y se inhiben por la presencia de azufre reducido, como sulfuro (H₂S), cisteína o GSH (Kopriva y Koprivova, 2004).

La SiR de plantas es una proteína formada por dos subunidades de 70kD que contiene un grupo sirohemo y una agrupación sulfo-férrica (4Fe-4S) como grupos prostéticos. La ferredoxina actúa como donador fisiológico de los seis electrones necesarios para la reducción del sulfito por la SiR. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* existe un solo gen que codifica una SiR y se ha demostrado que la disminución de esta actividad se traduce en una respuesta significativa en el metabolismo primario y secundario (Khan et al., 2010).

1.2. Biosíntesis de cisteína

La última etapa de la asimilación fotosintética de sulfato, la incorporación del sulfuro a esqueletos carbonados, conlleva la formación de la molécula de cisteína. La biosíntesis de cisteína se produce mediante la reacción secuencial de dos enzimas: la serina acetiltransferasa (SAT, EC 2.3.1.30) que produce el intermediario O-acetilserina (OAS) a partir de acetil-coenzima A (acetil-CoA) y serina, y la O-acetilserina (tiol) liasa (OASTL, EC 2.5.1.47), la cual incorpora el sulfuro a la OAS produciendo cisteína, esta última enzima requiere piridoxal 5'-fosfato (PLP) como cofactor (Figura 2) (Barroso, 1997).

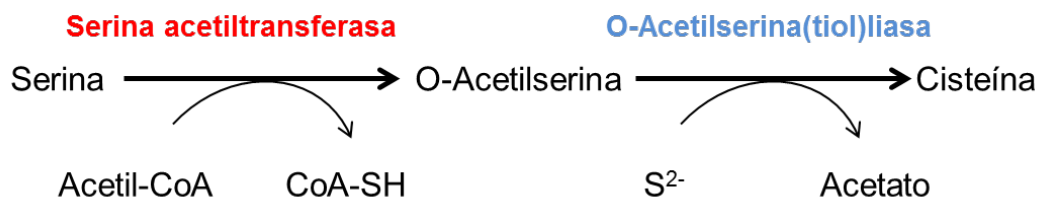


Figura 2: Reacciones enzimáticas catalizadas por la Serina acetiltransferasa (SAT) y la O-Acetilserina(tiol)liasa (OASTL).

Estas dos enzimas forman el complejo hetero-oligomérico cisteína sintasa, inicialmente descrito en bacterias y más tarde estudiado en plantas. Las interacciones entre las proteínas dentro del complejo modifican sustancialmente las propiedades cinéticas de la SAT, haciéndola más eficiente para la producción de OAS. En cambio, la OASTL es más activa en su forma libre y su actividad se ve drásticamente reducida cuando se encuentra formando parte del complejo junto con la SAT (Droux et al., 1998; Wirtz y Hell, 2006). La formación de este complejo proporciona un mecanismo efectivo para modular la producción de cisteína, y es dependiente de las cantidades relativas de sulfuro y OAS disponibles, por lo que ha sido considerado un sensor del azufre intracelular de la planta (Yi et al., 2010).

Las células vegetales contienen diferentes isoformas de ambas enzimas, SAT y OASTL, localizadas en el citosol, cloroplastos y mitocondrias, lo que resulta en la existencia de diferentes conjuntos o “pools” subcelulares de cisteína. Sin embargo, el citosol es el compartimento donde se sintetiza la mayor parte de la cisteína, a pesar de que las moléculas precursoras de ésta, OAS y sulfuro, se sintetizan mayoritariamente en la mitocondria y el cloroplasto, respectivamente (Figura 3).

La planta modelo *Arabidopsis thaliana* es la planta más investigada y en su genoma se han identificado cinco genes SAT (Howarth et al., 2003) y nueve OASTL (Wirtz et al., 2004) (Tabla 1). El hecho de que exista un mayor número de isoformas OASTL que de SAT llevó a cuestionar si todas las OASTL forman complejos con sus respectivas SAT o si algunas OASTL de *Arabidopsis* tienen funciones diferentes a la de síntesis de cisteína, como ha sido demostrado por nuestro grupo recientemente.

En *A. thaliana*, las isoformas SAT y OASTL más abundantes a nivel transcripcional están codificadas por los genes *SAT5* (At5g56760) y *OAS-A1* (At4g14880), y se localizan en el citosol. Las mayoritarias en el cloroplasto están codificadas por *SAT1* (At1g55920) y *OAS-B* (At2g43750), y *SAT3* (At3g13110) y *OAS-C* (At3g59760) codifican las isoformas mitocondriales (Barroso et al., 1995; Howarth et al., 2003; Haas et al., 2008; Heeg et al., 2008; López-Martín et al., 2008; Watanabe et al., 2008a; Watanabe et al., 2008b) (Figura 3).

Las enzimas SAT de plantas contienen 2 dominios muy conservados: el dominio N-terminal, donde predominan estructuras α -hélices, está involucrado en la interacción proteína-proteína entre las subunidades SAT, mientras que el dominio C-terminal esencial para la catálisis y la interacción de SAT con OASTL posee una estructura de hojas β plegadas (Wirtz y Hell, 2006). Las isoformas mayoritarias SAT5, SAT1 y SAT3 comparten entre ellas una mayor homología de secuencia, a pesar de albergar las dos últimas sus correspondientes péptidos de tránsito. Sin embargo, las secuencias C-terminales de las isoformas minoritarias SAT2 y SAT4, localizadas en el citosol, difieren considerablemente de las anteriores. Éstas presentan una baja afinidad por los sustratos serina y acetil-CoA y se postula que podrían no interaccionar con las OASTLs en el complejo cisteína sintasa, por lo que se cree que pueden desempeñar funciones metabólicas diferentes o adicionales a la de la síntesis de OAS (Kawashima et al., 2005). A pesar de ello, las cinco isoformas SAT presentan una redundancia funcional *in vivo*, lo que indica que tanto SAT4 como SAT2 son suficientes para la supervivencia de la planta (Watanabe et al., 2008b). El 90% de la actividad SAT reside en la mitocondria mientras que el resto se reparte entre el cloroplasto y el citosol (Droux, 2003), por lo que la mitocondria es el compartimento subcelular donde se sintetiza la mayoría de la OAS a través de la acción de SAT3 (Figura 3). Otra diferencia entre las distintas isoformas SAT de *Arabidopsis* es la sensibilidad que presentan a la inhibición por cisteína. SAT5 y SAT4 son muy sensibles a la retro-inhibición por cisteína, la isoforma SAT3 exhibe una sensibilidad intermedia mientras que la actividad de SAT1 y SAT2 no se ve afectada por la presencia de cisteína (Noji et al., 1998; Wirtz et al., 2001; Kawashima et al., 2005).

La enzima OASTL es un homodímero de 60-70 kDa de peso molecular que contiene como grupo prostético dos moléculas de PLP por dímero (León et al., 1987). Las proteínas pertenecientes a esta familia poseen diferentes grupos de aminoácidos conservados involucrados en la unión al cofactor, en la unión al sustrato OAS, en la incorporación del sulfuro así como en la interacción con SAT (Bonner et al., 2005). Las isoformas OASTL mayoritarias (OAS-A1, OAS-B y OAS-C) son consideradas auténticas OASTL porque catalizan la síntesis de cisteína a partir de OAS y sulfuro, y por su capacidad para interaccionar con SAT, lo que ha sido demostrado en varios trabajos (Bonner et al., 2005; Heeg et al., 2008; Jez y Dey, 2013).

En la mitocondria existe además otra isoforma OASTL mayoritaria denominada CAS-C1 (At3g61440), previamente CYS-C1, que posee actividad β -cianoalanina sintasa (CAS) (Hatzfeld et al., 2000; Yamaguchi et al., 2000) (Figura 3). Esta enzima cataliza la conversión de cisteína y cianuro en sulfuro y β -cianoalanina. El sulfuro producido en esta reacción es utilizado como sustrato para la formación de cisteína por la OAS-C. Así, se genera un ciclo donde la OAS-C sintetiza cisteína que es usada a su vez por la CAS-C1 para detoxificar el cianuro y en cuya reacción se forma sulfuro que cierra el ciclo incorporándose a la ruta de síntesis de cisteína por OAS-C (Álvarez et al., 2012c). La actividad CAS mitocondrial es esencial para mantener

bajos los niveles de cianuro, permitiendo el correcto desarrollo de los pelos radicales e interviniendo en la respuesta de la planta a la infección por patógenos. Estos estudios proponen a la molécula de cianuro como una nueva molécula señalizadora en plantas (García et al., 2010; García et al., 2013; García et al., 2014).

El resto de proteínas OASTL, como CYS-D1 (At3g04940), CYS-D2 (At5g28020) y DES1 (At5g28030) en el citosol y SCS (At3g03630) en el cloroplasto (Figura 3), presenta niveles de expresión inferiores a las isoformas arriba descritas y fueron identificadas por homología de secuencia una vez completado el genoma de *A. thaliana*. Aunque inicialmente a estas isoformas minoritarias se les atribuyó un papel auxiliar con respecto a las principales isoformas, recientes investigaciones realizadas con SCS y DES1 han aportado información acerca de sus funciones y de las reacciones enzimáticas que catalizan (Gotor et al., 2010). SCS (previamente denominada CS26) es una S-sulfocisteína sintasa localizada en el lumen tilacoidal que cataliza la incorporación de tiosulfato al esqueleto OAS para formar S-sulfocisteína. Esta actividad enzimática presente en bacterias, ha sido descrita por primera vez en plantas y parece ser esencial para el correcto funcionamiento del aparato fotosintético en condiciones de crecimiento de día largo; además, podría actuar como un sensor del estado redox del cloroplasto (Bermúdez et al., 2010; Bermudez et al., 2012; Gotor y Romero, 2013).

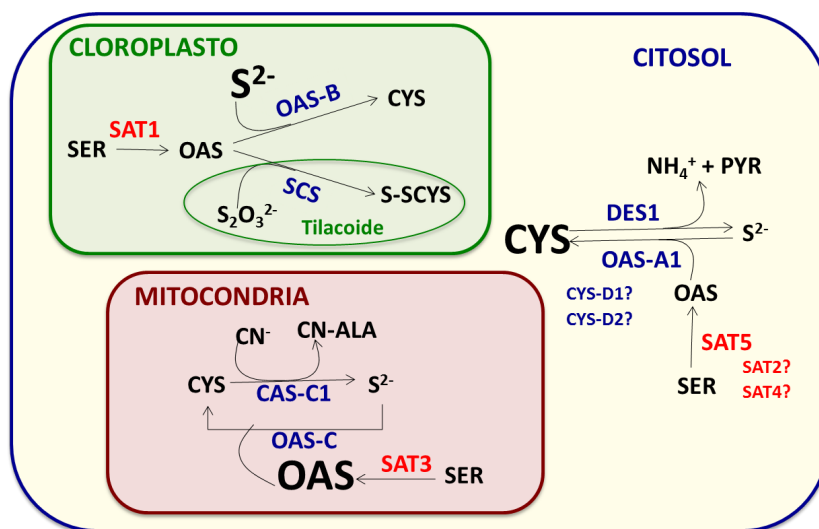


Figura 3: Representación esquemática de la localización subcelular de las enzimas SAT y OASTL en *Arabidopsis thaliana*. Las isoformas con actividad SAT se muestran en rojo y las isoformas OASTL en azul. El metabolito más abundante en cada compartimento celular aparece con un formato de letra más grande. Las isoformas OASTL y SAT minoritarias con función por determinar aparecen escritas con un signo de interrogación.

Tabla 1: Genes *SAT* y *OASTL* presentes en el genoma de *A. thaliana*.

Gen	Locus	Localización subcelular de la proteína
<i>SAT1</i>	At1g55920	Cloroplasto
<i>SAT2</i>	At2g17640	Citosol
<i>SAT3</i>	At3g13110	Mitocondria
<i>SAT4</i>	At4g35640	Citosol
<i>SAT5</i>	At5g56760	Citosol
<i>OAS-A1</i>	At4g14880	Citosol
<i>OAS-B</i>	At2g43750	Cloroplasto
<i>OAS-C</i>	At3g59760	Mitocondria
<i>CYS-D1</i>	At3g04940	Citosol
<i>CYS-D2</i>	At5g28020	Citosol
<i>CAS-C1</i>	At3g61440	Mitocondria
<i>SCS</i>	At3g03630	Cloroplasto
<i>DES1</i>	At5g28030	Citosol

1.3. DES1: una nueva L-cisteína desulfhidrasa

Nuestro grupo ha caracterizado una de las isoformas OASTL minoritarias presentes en el citosol, conocida como CS-like (“cysteine synthase-like”). Mediante la expresión, purificación y caracterización bioquímica de la proteína recombinante se ha determinado que CS-like no es una verdadera OASTL con una función auxiliar como se creía, sino una nueva L-cisteína desulfhidrasa (E.C 4.4.1.1) que cataliza la desulfuración de cisteína produciendo sulfuro, amonio y piruvato, y ha sido nombrada como DES1 (Álvarez et al., 2010) (Figura 3).

Esta conclusión proviene principalmente de nuestros estudios enzimáticos llevados a cabo con la proteína recombinante DES1, que durante el proceso de purificación mostró un incremento específico de la actividad desulfhidrasa en comparación con otras actividades enzimáticas que fueron ensayadas. Además, se caracterizaron los productos de la reacción catalizada por DES1, se determinó la estequiometría y se calcularon las constantes cinéticas de la reacción enzimática, mostrándose que la afinidad que presentaba por la L-cisteína como sustrato era 10 veces superior a la que presentaba por la OAS. Una característica fundamental de las OASTL es su capacidad para interactuar con SAT. A pesar de la alta homología existente entre DES1 y el resto de OASTLs, un alineamiento realizado comparando las secuencias proteicas de DES1 y OAS-A1 ha revelado que la región responsable de la interacción con SAT no se encuentra conservada en la secuencia de DES1. Además, se han observado diferencias en los aminoácidos que forman un lazo implicado en la incorporación de sulfuro para formar

cisteína. Sin embargo, DES1 es una enzima PLP-dependiente ya que la región que interacciona con el cofactor se encuentra conservada en su secuencia (Álvarez et al., 2010).

Estos resultados apoyan los ensayos enzimáticos anteriores y los realizados por otros investigadores que indicaban que la proteína DES1 no era una verdadera OASTL sino una proteína con una actividad enzimática L-cisteína desulfhidrasa (Riemenschneider et al., 2005a).

El estudio de los mutantes de inserción de T-DNA del gen *DES1* ha permitido demostrar el impacto y la funcionalidad de DES1 en el metabolismo de la cisteína. La caracterización bioquímica de los mutantes de DES1, *des1-1* y *des1-2*, ha permitido determinar que la actividad L-cisteína desulfhidrasa es menor en los dos mutantes, y como consecuencia, el contenido de cisteína citosólica es entre un 20-25 % superior al que presentan sus respectivos ecotipos silvestres (Figura 4). El contenido en GSH también es superior en los mutantes. Como consecuencia del incremento en el contenido de cisteína citosólica, los mutantes presentan una desregulación de los genes *SULTR* y *APS reductasa* implicados en la ruta de asimilación del sulfato, lo que pone de manifiesto la importancia de la mutación de DES1 en el metabolismo de la planta. Los mutantes *des1* presentan además una mayor capacidad antioxidante y acumulan menos especies reactivas del oxígeno (ROS) en presencia de metales como el cadmio (Figura 5A) o de compuestos oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en comparación con las plantas silvestres, lo que se traduce en una menor sensibilidad de los mutantes *des1* a estos estreses (Figura 5B) (Álvarez et al., 2010). Por otro lado, la mutación en *DES1* produce una aceleración de la senescencia y como consecuencia, los mutantes presentan un fenotipo de floración temprana (Figura 5C) y una mayor expresión de genes asociados a senescencia como *SAG12* (gen que codifica una cisteín-proteasa inducida específicamente durante la senescencia y poco afectada por factores ambientales), *PR1* (gen de respuesta a ácido salicílico) y *NAP* (miembro de la familia de factores de transcripción NAC) en comparación con las plantas silvestres. Datos obtenidos a partir de la plataforma online Genevestigator muestran que el mayor nivel de expresión de *DES1* se alcanza durante la senescencia de la planta, lo que coincide con los resultados obtenidos por nuestro grupo y pone de manifiesto la importancia de DES1 durante esta etapa del desarrollo. La senescencia está asociada con una intensa actividad proteolítica que conlleva la liberación de cisteína, por lo que la desulfuración de este aminoácido debe ser una forma de evitar su acumulación en la célula así como de las especies tóxicas derivadas de esta molécula. Estos resultados demuestran el importante papel de DES1 en el mantenimiento de la homeostasis de cisteína en el citosol de forma coordinada con la OAS-A1 en determinados estadios del desarrollo o bajo ciertas perturbaciones ambientales. El citosol es el principal compartimento donde se sintetiza cisteína en la célula (Figura 3), y además de las importantes funciones de este aminoácido en el metabolismo primario y secundario de la planta, no hay que olvidar que la cisteína es tóxica cuando alcanza una

determinada concentración ya que puede promover la generación de ROS en presencia de hierro mediante la reacción de Fenton (Park y Imlay, 2003).

En relación también con los mutantes *des1*, en nuestro laboratorio se ha estudiado el papel de la cisteína citosólica en la respuesta de la planta a la infección por distintos patógenos. Para ello, se han empleado mutantes *des1* y mutantes *oas-1* que presentan un incremento y una disminución del contenido de cisteína citosólica, respectivamente. La alteración del contenido en cisteína en los mutantes afecta a la resistencia basal que presentan frente al ataque de patógenos; por un lado, los mutantes *des1* muestran una mayor resistencia a los agentes patógenos, mientras que los mutantes *oas-1* exhiben el fenotipo opuesto, es decir, son más sensibles a las infecciones. Los resultados obtenidos tras el análisis transcriptómico de los genes relacionados con la respuesta inmune y la cuantificación de la expresión por RT-PCR cuantitativa reforzaron la hipótesis de la implicación de la cisteína en la respuesta al estrés biótico en las plantas. En el caso de los mutantes *des1*, los niveles de ácido salicílico (SA) son superiores a los que presentan las plantas silvestres, así como los niveles de expresión de los genes *WRKY54* (factor de transcripción implicado en inmunidad) y *PR1*, cuya expresión es constitutiva (Álvarez et al., 2012a). Debido a esto, los mutantes *des1* exhiben una resistencia sistémica adquirida (SAR) constitutiva, lo que los hace más resistentes a la infección por patógenos biótrosos y necrótrofos (Figura 5D).

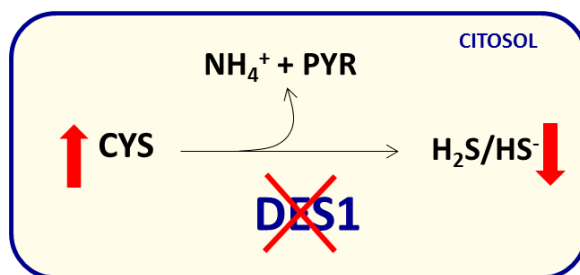


Figura 4: Situación en el mutante *des1*. La supresión de DES1 provoca un aumento del contenido en cisteína y una disminución de los niveles de H₂S en el citosol de *A. thaliana*.

Debido a la reacción que cataliza DES1, su deficiencia no solo produce un incremento en el contenido de cisteína en el citosol, sino que también provoca una disminución de los niveles de H₂S en este mismo compartimento (Figura 4). Los resultados obtenidos mediante el estudio y la caracterización de la proteína DES1 así como de los efectos de su mutación, junto con el creciente número de artículos científicos que describen el papel señalizador de la molécula de H₂S en las plantas, nos hizo plantearnos si el sulfuro generado por la acción de la proteína DES1 participa en la regulación de determinados procesos fisiológicos en los sistemas vegetales.

Los mutantes *des1* presentan una reducción del 30% en el contenido total de H₂S en el citosol en comparación con las plantas silvestres y esta variación en la cantidad de H₂S presente en la célula tiene importantes consecuencias fisiológicas en los mutantes.

El fenotipo de senescencia prematura y la inducción transcripcional de genes asociados a senescencia que presentan los mutantes *des1* (Álvarez et al., 2010) fue analizado en mayor profundidad por nuestro grupo de investigación en un trabajo posterior. Durante la senescencia foliar, en las células del mesófilo tiene lugar la formación *de novo* de unas vesículas denominadas vacuolas asociadas a senescencia (SAVs). Estas SAVs se observan en los protoplastos de los mutantes *des1*, y no en las plantas silvestres (Álvarez et al., 2012b) (Figura 5E). Las SAVs contienen gran cantidad de proteasas en su interior como SAG12. Como se había demostrado con anterioridad, el mutante *des1* presenta una inducción de *SAG12* y otros genes implicados en senescencia (Álvarez et al., 2010). El análisis transcripcional realizado en plantas mutantes *des1* y plantas silvestres ha revelado una alteración del perfil transcripcional en los mutantes a los 30 días de crecimiento, donde han sido contabilizados un total de 1624 genes desregulados (Figura 5F). En estadios más tempranos, a los 20 días de cultivo, solo 24 genes se expresan de forma desigual. De los genes desregulados en los estadios más tardíos de crecimiento (30 días), una gran proporción codifican proteínas relacionadas con la ubiquitinación y se sabe que esta ruta interviene activamente en la degradación de proteínas durante la senescencia (Yoshida, 2003; Lin y Wu, 2004).

Está ampliamente aceptada la conexión entre la senescencia y la autofagia y la mayoría de genes implicados en autofagia que han sido descritos inicialmente en levaduras han sido identificados en *Arabidopsis* y otras plantas (Doelling et al., 2002; Yoshimoto et al., 2009). La deficiencia en *DES1* produce también una inducción del proceso autofágico en las plantas mutantes, que se caracteriza por la acumulación de la proteína autofágica ATG8 en su forma libre y en su forma lipídica (ATG8-PE) (Álvarez et al., 2012b) (Figura 5G).

Puesto que la mutación de *DES1* provoca la disminución de la generación de H₂S en el citosol de *Arabidopsis*, el restablecimiento de la capacidad de generar H₂S en este compartimento celular, ya sea mediante la adición exógena de compuestos donadores de sulfuro como el NaSH o el Na₂S o por complementación genética, elimina las diferencias fenotípicas observadas entre los mutantes *des1* y las plantas silvestres. El sulfuro exógeno revierte el fenotipo de senescencia prematura, la presencia de SAVs, la alteración del perfil transcripcional y la inducción de la autofagia (Álvarez et al., 2012b). El efecto del sulfuro como regulador negativo de la autofagia no se limita a lo observado en los mutantes *des1*. En plantas silvestres de *A. thaliana* cultivadas en limitación de carbono (oscuridad), condición conocida por activar el proceso de autofagia, el H₂S revierte esta inducción disminuyendo la acumulación tanto de la proteína ATG8 soluble como de su forma lipídica (Álvarez et al., 2012b).

Estos resultados indican que el sulfuro generado en el citosol a partir de la degradación de la cisteína por DES1 actúa como un regulador negativo de la autofagia y un modulador del perfil transcripcional de *Arabidopsis* y estos efectos son independientes del estado nutricional de azufre de la planta.

Por lo tanto, DES1 no solo es responsable de mantener la homeostasis de cisteína en el citosol de forma coordinada con OAS-A1, sino que también modula la producción de H₂S con fines señaladores en dicho compartimento celular (Álvarez et al., 2012b; Gotor et al., 2013; Romero et al., 2013).

En esta Tesis Doctoral se ha profundizado en el estudio de la proteína DES1. Se ha realizado un análisis *in silico* de la secuencia promotora de *DES1* así como de su expresión espacio-temporal en plantas de *A.thaliana* (Laureano-Marín et al., 2014).

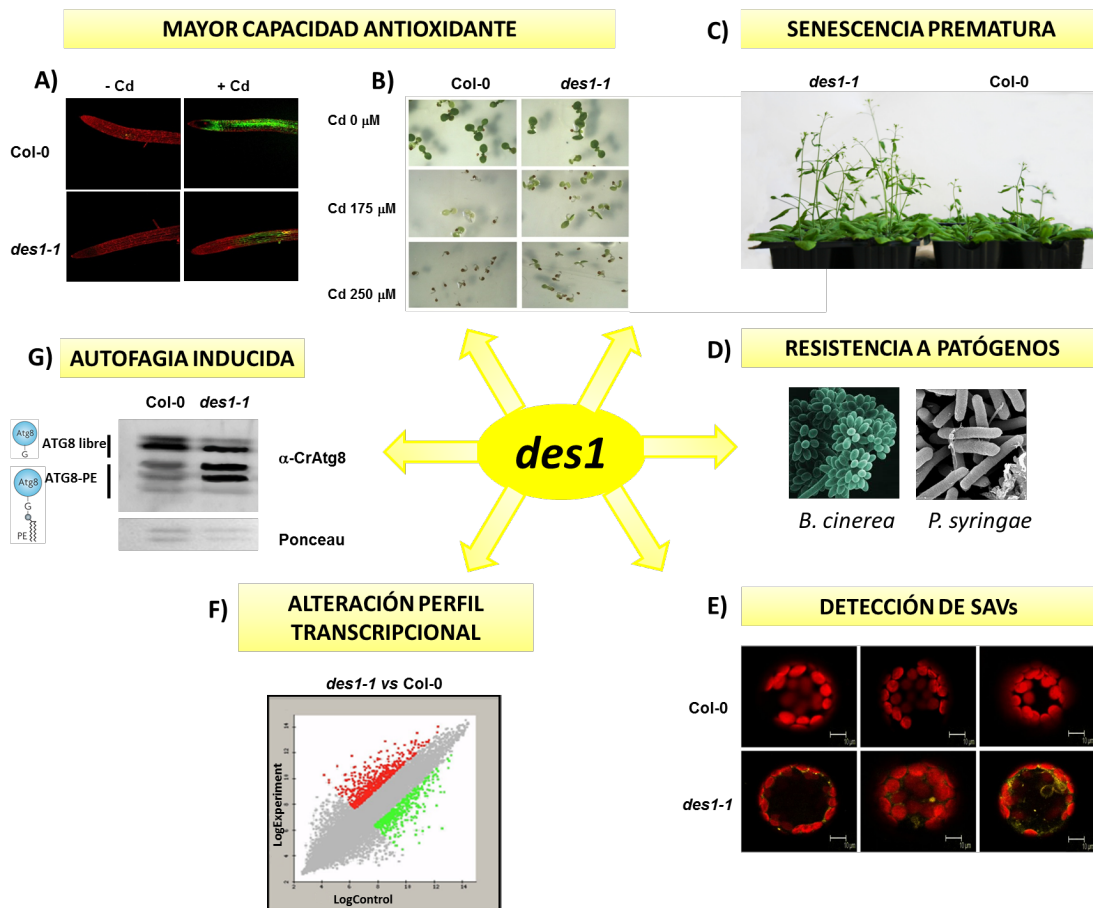


Figura 5: Características fenotípicas del mutante *des1*. Los mutantes *des1* presentan una mayor capacidad antioxidante en presencia de cadmio, A) acumulan menos H₂O₂ (color verde) en las raíces y B) exhiben una mayor tasa de supervivencia que las plantas silvestres. C) Además los mutantes se caracterizan por su fenotipo de senescencia prematura y D) de resistencia a diferentes tipos de patógenos. E) La deficiencia en DES1 provoca la formación *de novo* de SAVs (color amarillo) en las células del mesófilo de los mutantes así como F) la alteración del perfil transcripcional a los 30d de cultivo y G) la

inducción de la autofagia, analizada mediante la inmunodetección de la proteína marcadora de autofagia, ATG8, en su versión libre y en su forma lipídica (ATG8-PE).

2. El sulfuro de hidrógeno

2.1. Definición y propiedades físico-químicas

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un gas incoloro, inflamable, más denso que el aire y con un olor característico a huevos podridos. En los últimos años, se ha producido un cambio en el concepto que se tenía de este gas, y ha pasado de ser solamente considerada una sustancia tóxica para la vida y el medioambiente a ser reconocido además como una molécula gasotransmisora implicada en señalización.

En solución acuosa, el H_2S se comporta como un ácido débil, disociándose en el protón (H^+) y el anión hidrosulfuro (HS^-), que a su vez, se disocia en H^+ y S^{2-} , como se ilustra en la siguiente reacción:



A temperatura ambiente y pH fisiológico (7,4), menos del 20% del sulfuro se encuentra en la forma no disociada, H_2S , mientras que el resto se encuentra en su forma ionizada como HS^- y H^+ . La disociación de HS^- hasta S^{2-} solo ocurre a valores altos de pH, por lo que es insignificante en condiciones fisiológicas. La coexistencia de H_2S y HS^- en solución acuosa hace que no sea posible separar sus efectos y concluir cuál de ellos está implicado en los procesos de señalización (Li y Lancaster, 2013). Por ello, en esta Tesis Doctoral el término sulfuro (H_2S) se utiliza indistintamente para hacer referencia a estas dos especies ($\text{H}_2\text{S} / \text{HS}^-$).

El H_2S es muy lipófilo, razón por la cual atraviesa con facilidad las membranas celulares. Por su parte el HS^- , que es la especie de sulfuro prevalente, tiene afinidad por los centros metálicos de ciertas moléculas (Martelli et al., 2012). Estas características le confieren al sulfuro un alto potencial biológico.

En animales, el H_2S puede llegar a ser letal a altas dosis. La presencia de sulfuro en la mitocondria produce la inhibición de la citocromo c oxidasa, también conocido como el complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, bloqueando de esta forma la respiración celular (Dorman et al., 2002; Mancardi et al., 2009). La toxicidad del sulfuro puede afectar a distintos sistemas, aunque el más afectado es el sistema nervioso. Sin embargo, en la actualidad hay un gran número de trabajos que describen el papel señalizador que el H_2S posee en animales (Mustafa et al., 2009; Wagner, 2009; Tan et al., 2010), y este efecto se hace patente cuando se utilizan concentraciones de H_2S por debajo del umbral de toxicidad. Por ello, el H_2S ha sido reconocido como el tercer gas con una función señalizadora junto con el óxido nítrico (NO) y el

monóxido de carbono (CO) en mamíferos, y ha sido incluido dentro del grupo de los denominados gasotransmisores (Gadalla y Snyder, 2010; Wang, 2014).

En plantas, los efectos nocivos del H₂S fueron descritos por primera vez en la década de los 70, en un estudio realizado en diferentes cultivares de arroz en los que el H₂S producía una inhibición de la producción de oxígeno y una disminución en la absorción de nutrientes como el fósforo (Joshi et al., 1975). Otro trabajo describió la aparición de lesiones foliares y la reducción del crecimiento de diferentes especies de plantas tras ser fumigadas con H₂S. Estos resultados indicaban que el sulfuro actúa como una fitotoxina para un gran número de especies vegetales (Thompson y Kats, 1978). Sin embargo, de forma similar a lo que ha ocurrido en animales, el papel que el sulfuro desempeña en las plantas ha dado un giro drástico y ha pasado de ser considerado una sustancia perjudicial a convertirse en un nuevo gasotransmisor de importancia comparable a la del NO y el H₂O₂ (García-Mata y Lamattina, 2013; Calderwood y Kopriva, 2014).

2.2. El H₂S como molécula señal

Para que el sulfuro sea considerado una molécula señal, éste ha de cumplir una serie de características. Por un lado, debe ser producido endógenamente por un sistema biológico, debe generar una respuesta cuando es percibido por algún componente celular y, por último, debe ser eliminado para hacer desaparecer la respuesta que genera.

2.2.1. Producción y catabolismo del H₂S

- **Mamíferos**

En mamíferos, el H₂S puede ser producido endógenamente mediante la acción de enzimas que participan en el metabolismo de la cisteína. Entre ellas se encuentran la cistationina β-sintasa (CBS, EC 4.2.1.22) y la cistationina γ-liasa (CSE, EC 4.4.1.1) que intervienen en la ruta de transulfuración. CBS y CSE producen H₂S a partir de la degradación de aminoácidos azufrados como la L-cisteína, L-homocisteína y L-cistationina y necesitan de la presencia de PLP como cofactor (Xu et al., 2014) (Figura 6). A nivel tisular, la CBS se expresa principalmente en el sistema nervioso y el hígado; mientras que la CSE lo hace, además de en el hígado, en el sistema vascular, siendo ambas enzimas citosólicas. Por otro lado, la cisteína aminotransferasa (CAT, EC 2.6.1.3) y la 3-mercapto piruvato sulfurtransferasa (3-MST, EC 2.8.1.2) (Olas, 2015) están implicadas en el catabolismo de la cisteína y mediante su acción conjunta generan H₂S a partir de L-cisteína en presencia de α-cetoglutarato (Shibuya et al., 2009) (Figura 6). La localización de estas enzimas se limita al tejido vascular y al cerebro, y pueden encontrarse tanto en el citosol como en la mitocondria (Kabil y Banerjee, 2010; Wang, 2012).

La generación no enzimática de H_2S en mamíferos es minoritaria y tiene lugar mediante distintas reacciones químicas a partir de glucosa, glutatión, polisulfuros y azufre elemental (Kolluru et al., 2013).

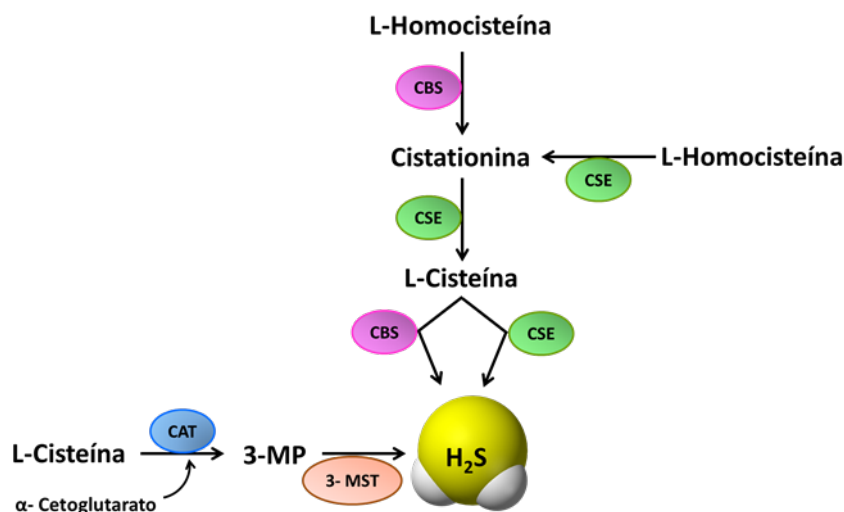


Figura 6: Producción enzimática de H_2S en mamíferos. En la síntesis enzimática de H_2S en animales intervienen tres enzimas, la cistationina β -sintasa (CBS), la cistationina γ -liasa (CSE) y la 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST), ésta última utiliza 3-mercaptopiruvato (3-MP) producido por la cisteína aminotransferasa (CAT). (Kolluru et al., 2013).

Una vez sintetizado, el H_2S puede ejercer sus efectos directamente a través de su interacción con diferentes moléculas de señalización intracelular, o ser almacenado, en cantidades muy bajas, y liberado más tarde en respuesta a una señal fisiológica. En los mamíferos, el H_2S se almacena formando enlaces divalentes de azufre, como persulfuros (R-SSH) o polisulfuros (RS_nR), con la formación de un azufre sulfano (S^0). El H_2S puede ser liberado de este “pool” en condiciones reductoras (Wang, 2012; Shibuya y Kimura, 2013). No obstante, el H_2S suele ser rápidamente metabolizado por diferentes vías. Así, dicho gas puede reaccionar con la tiol S-metiltransferasa, conduciendo a su metilación y formación de dimetil sulfuro (Barr y Calvert, 2014). El H_2S puede además ser catabolizado por desprotonación seguida de una oxidación mitocondrial, proceso que se produce en varios tejidos, como el encéfalo, el pulmón, el riñón y el intestino y que descompone el H_2S en persulfato, sulfito, tiosulfato y sulfato (Kabil y Banerjee, 2010; Barr y Calvert, 2014). Más del 70% del total de sulfuro excretado en la orina se encuentra en forma de sulfato (Kabil y Banerjee, 2010). El H_2S también puede ser neutralizado mediante su reacción directa con metahemoglobina hasta sulfohemoglobina o con otras moléculas que presentan en su estructura grupos disulfuro o metálicos, como el glutatión oxidado (GSSG) y la catalasa (Figura 7).

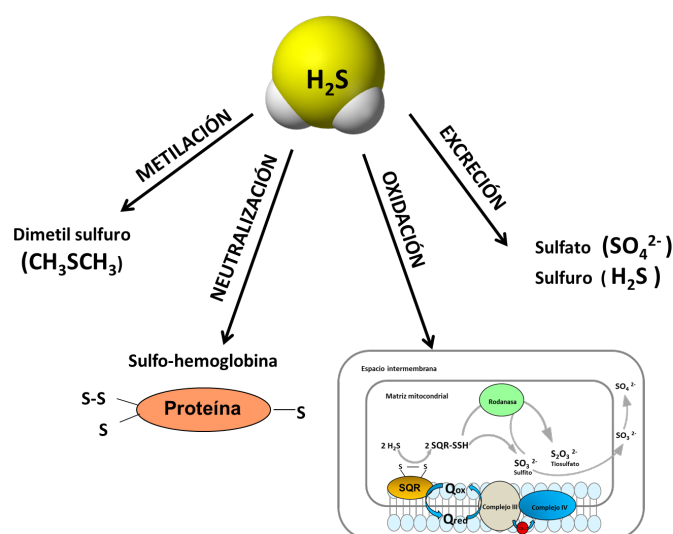


Figura 7: Representación esquemática del catabolismo del H₂S en mamíferos.

- **Plantas**

En las plantas, el cloroplasto es la principal fuente de sulfuro. Éste es producido en la ruta de asimilación fotosintética del sulfato en una reacción catalizada por la SiR (EC 1.8.7.1) (Takahashi et al., 2011; García et al., 2015) (Figura 8). La concentración subcelular de sulfuro oscila entre los 125 μM presente en el cloroplasto y los 55 μM del citosol (Krueger et al., 2009). La presencia de sulfuro en otros compartimentos requiere su transporte a través de la membrana del cloroplasto, y se ha propuesto que el H₂S alcanza el citosol difundiéndose libremente a través de la membrana que recubre al cloroplasto. Sin embargo, el pH básico del estroma del cloroplasto en condiciones de iluminación hace que el sulfuro esté presente principalmente en su forma disociada, siendo incapaz de atravesar las membranas (Kabil y Banerjee, 2010). Su translocación al citosol necesitaría por tanto de la presencia de un transportador activo en la membrana plastidial que, hasta la fecha, no ha sido identificado. En la mitocondria, el sulfuro producido durante la síntesis de β -cianoalanina por parte de la CAS-C1 (EC 4.4.1.9) (Figura 8) es posteriormente utilizado por la OAS-C como sustrato, generando un ciclo, como se describió anteriormente. De forma similar a lo que ocurre en el cloroplasto, el pH del estroma mitocondrial es básico en células metabólicamente activas debido a la existencia de una bomba de protones en la membrana interna (Santo-Domingo y Demarex, 2012), por lo que el sulfuro está presente predominantemente en su forma iónica y no puede atravesar las membranas. La necesidad de un transportador activo en este compartimento es evidente, y aunque aún no ha sido identificado en plantas, sí se ha descrito en bacterias (Czyzewski y Wang, 2012). Por ello, el sulfuro presente en el citosol es generado metabólicamente a partir de otras fuentes.

La producción de sulfuro en los diferentes compartimentos subcelulares de la planta está muy relacionada con el metabolismo de la cisteína y se han descrito varios tipos de enzimas responsables de la degradación de cisteína y la concomitante producción de H₂S en diferentes especies vegetales (Papenbrock et al., 2007).

Uno de estos tipos de enzimas son las proteínas NifS-like que pertenecen al grupo de las L-cisteína desulfurasas (EC 2.8.1.7) (Figura 8). Estas enzimas catalizan la conversión de cisteína en alanina y sulfuro elemental o H₂S y requieren de PLP como cofactor. Estas proteínas son conocidas como NifS-like, porque esta actividad se describió por primera vez en la proteína NifS de *Azotobacter vinelandii*, que interviene en la biosíntesis de las agrupaciones sulfoféricas de la nitrogenasa (Zheng et al., 1993; Schmidt, 2005). Las plantas contienen tres proteínas NifS-like que están localizadas en la mitocondria, el cloroplasto y el citosol y proporcionan azufre para la biosíntesis de las agrupaciones sulfo-féricas de algunas proteínas y para la formación de biotina, tiamina y el cofactor de molibdeno (Kushnir et al., 2001; Leon et al., 2002; Pilon-Smits et al., 2002; Heidenreich et al., 2005).

Por otro lado, la actividad L-cisteína desulfhidrasa (EC 4.4.1.1.) (L-CDES), cataliza la formación de sulfuro, amonio y piruvato en cantidades equimolares en presencia de PLP. En *Arabidopsis*, se han descrito algunas L-CDES pero no han sido caracterizadas en detalle (Jin et al., 2013). Durante algún tiempo hubo controversia sobre la existencia de estas enzimas ya que en el proceso de biosíntesis de cisteína catalizado por las enzimas OASTLs, el sulfuro puede ser liberado en la reacción inversa. Nuestro grupo de investigación ha caracterizado en detalle la enzima DES1, descrita en la primera parte de la Introducción de esta Tesis, y ha demostrado que es una nueva L-CDES citosólica perteneciente a la familia OASTL responsable de la producción de H₂S en el citosol de *A. thaliana*. El H₂S generado mediante la actividad DES1 posee además importantes implicaciones fisiológicas y señalizadoras en la planta. Hasta la fecha, DES1 de *A. thaliana*, es la única L-CDES caracterizada en plantas junto con BnDES1 que ha sido caracterizada posteriormente en *Brassica napus* (Álvarez et al., 2010; Álvarez et al., 2012b; Romero et al., 2013; Xie et al., 2013) (Figura 8).

Además de las enzimas L-cisteína desulfhidrasas, se encuentran las D-cisteína desulfhidrasas (EC 4.4.1.15) (D-CDES) que usan específicamente D-cisteína como sustrato para generar piruvato, amonio y sulfuro (Figura 8). La actividad D-CDES ha sido descrita en diferentes organismos fotosintéticos como *Spinacia oleracea*, *Chlorella fusca*, *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus* y en cultivos de células en suspensión de *Nicotiana tabacum* (Rennenberg et al., 1987). Las D-CDES presentan una diferente sensibilidad a inhibidores y un diferente pH óptimo al que presentan las L-CDES (Schmidt, 1982; Rennenberg et al., 1987). En *A. thaliana*, se han identificado dos genes, At1g48420 y At3g26115, que codifican proteínas que presentan esta actividad dependiente de PLP (Riemenschneider et al., 2005b). El papel fisiológico de la D-cisteína y de la actividad D-CDES están todavía por clarificar (Papenbrock et al., 2007).

El sulfuro generado en las plantas puede ser eliminado del “pool” biodisponible mediante su incorporación a moléculas de OAS durante la biosíntesis de cisteína, llevada a cabo por las enzimas de la familia OASTL, descritas en detalle anteriormente.

Algunos autores han propuesto que la reacción química entre el H_2S y otras moléculas señal como el NO y ROS o con proteínas que contienen grupos tiólicos en su secuencia podría producir también una disminución de los niveles de H_2S libre en la célula, aunque esto aún no ha sido demostrado en sistemas vegetales (Lisjak et al., 2013).

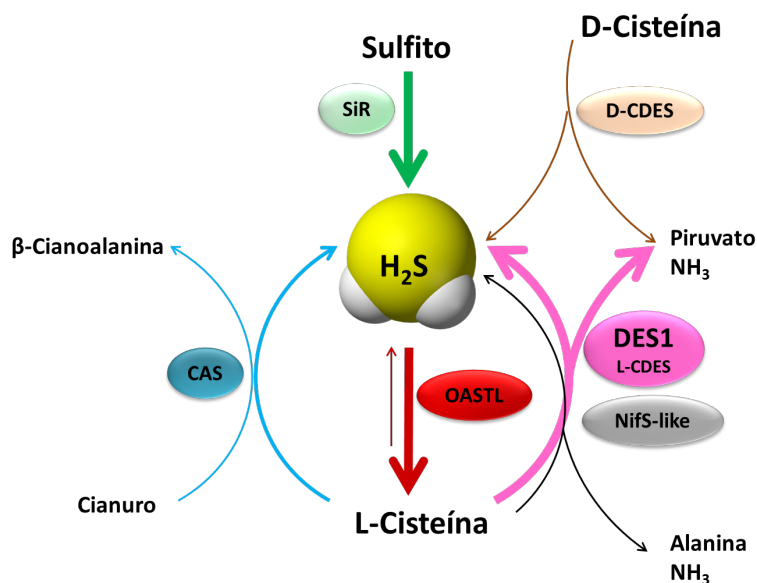


Figura 8: Enzimas implicadas en la producción de H_2S en *A. thaliana*. En plantas el H_2S es producido en diferentes reacciones enzimáticas. Las enzimas responsables son las siguientes: SiR, sulfito reductasa; D-CDES, D-cisteína desulfhidrasa; L-CDES, L-cisteína desulfurasas, entre las que se incluye DES1; proteínas NifS-like; OASTL, O-acetilserina(tiol)liasa; y CAS, β-cianoalanina sintasa. Las principales rutas productoras de H_2S están representadas por flechas gruesas. La enzima que cataliza una determinada reacción y su respectiva flecha aparecen con el mismo color.

2.3. Mecanismos de acción del H_2S

Actualmente, el número de estudios sobre los efectos fisiológicos del sulfuro en mamíferos y plantas está experimentando un crecimiento exponencial. Sin embargo, los mecanismos por los que el efecto fisiológico del sulfuro se transforma en la generación de una determinada respuesta biológica son poco conocidos.

2.3.1. El H_2S como antioxidante

En base a las propiedades químicas del H_2S , se han propuesto dos posibles mecanismos de acción. El primero de estos mecanismos está relacionado con las propiedades nucleófilas de esta

molécula, lo que permite la reacción del sulfuro con el oxígeno, el H_2O_2 o el peroxinitrito (ONOO^-), actuando de esta forma como un antioxidante (Kabil y Banerjee, 2010). Además de esta reacción directa del sulfuro con compuestos de oxígeno se han sugerido otros mecanismos en los que el H_2S actuaría con una función antioxidante, tales como los descritos a continuación.

El GSH es el principal antioxidante intracelular y la disminución de sus niveles produce una acumulación de ROS en la célula. El efecto antioxidante del H_2S puede ser también consecuencia de su capacidad de incrementar los niveles de GSH mediante la inducción de la enzima γ -glutamylcisteína sintetasa (γ -ECS), que participa en la síntesis de glutatión, y el transporte de cisteína, como se ha descrito en las neuronas (Kimura y Kimura, 2004).

Además, el H_2S puede reaccionar directamente con una molécula de GSSG y producir persulfuro de glutatión (GSSH) que presenta un mayor poder reductor que el que posee el GSH o el H_2S , tal como se ha demostrado en varias investigaciones (Rohwerder y Sand, 2003; Ida et al., 2014).

El H_2S inhibe los efectos citotóxicos del ONOO^- formado por la reacción entre el NO y el anión superóxido (O_2^-). El efecto antioxidante del H_2S parece deberse a su reacción directa con el ONOO^- , con la concomitante formación de sulfinilnitrito (HS(O)NO). Este nuevo producto tiene además el potencial de liberar NO a la vez que neutraliza los efectos apoptóticos y oxidantes del ONOO^- (Filipovic 2012).

La enzima superóxido dismutasa de Cobre-Zinc (CuZn SOD) contiene un azufre sulfano (S^0) formando un enlace entre dos residuos de cisteína presentes en cada uno de los monómeros que forman el dímero. Este enlace puede albergar hasta un total de siete átomos de azufre (You et al., 2010). La estabilidad y actividad de la CuZn SOD aumenta en presencia de NaSH, que promueve la formación de los persulfuros, por lo que las propiedades antioxidantes atribuidas al H_2S pueden deberse, en parte, a este efecto (Sun et al., 2012).

2.3.2. S-sulfhidratación de proteínas

El segundo mecanismo propuesto por el que la señal generada por H_2S es transformada en una respuesta biológica es conocido como S-sulfhidratación. Este mecanismo implica la modificación post-traducciona del grupo tiol (R-SH) de los residuos de cisteína de las proteínas y la generación de grupos persulfuro (R-SSH) (Mustafa et al., 2009; Paul y Snyder, 2012). El mecanismo químico mediante el cual se produce esta modificación es objeto de controversia y parece que son necesarias diferentes reacciones químicas para que se lleve a cabo. Algunos autores indican que, dependiendo del ambiente que rodee al grupo tiol del residuo de cisteína, éste puede formar un anión tiolato (R-S^-) que puede ser posteriormente oxidado por ROS generando de esta forma un residuo sulfénico (R-SO), que en última instancia reacciona con el H_2S (como HS^- o como H_2S) para formar el grupo persulfuro (R-SSH) (Krishnan et al., 2011).

Otros autores proponen que la reacción entre el H₂S y el oxígeno produce azufre sulfano (S⁰) que después interacciona con el grupo tiol para producir el persulfuro (Toohey, 2011).

La transformación de un grupo R-SH en un grupo R-SSH puede modificar la reactividad química de las enzimas o la función específica de las proteínas no enzimáticas y posiblemente puede influir en su accesibilidad a sus respectivas dianas.

En mamíferos, se ha estudiado en detalle los efectos de la S-sulfhidratación sobre determinadas proteínas. La actividad de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se ve incrementada por la S-sulfhidratación de un residuo de cisteína, Cys¹⁵⁰, que casualmente es el mismo residuo identificado como diana de la S-nitrosilación. La modificación de un mismo residuo de cisteína por ambos tipos de modificaciones post-traduccionales podría suponer un mecanismo de regulación adicional de la actividad de esta proteína (Mustafa et al., 2009). Los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) constituyen otra de las dianas biológicas de la S-sulfhidratación mejor caracterizadas en mamíferos. El H₂S provoca la S-sulfhidratación de un residuo de cisteína, Cys⁴³, localizado en la subunidad estructural Kir6.1 de los canales de K_{ATP}. Esta S-sulfhidratación provoca una activación del canal, con la consiguiente despolarización de la membrana y cierre de los canales de Ca²⁺, lo que produce la relajación de la musculatura lisa que envuelve a los vasos sanguíneos disminuyendo con ello la presión arterial (Mustafa et al., 2011). Aunque la S-sulfhidratación normalmente activa a sus proteínas diana, la actividad de la proteína tirosín fosfatasa 1B (PTP1B) disminuye como consecuencia de esta modificación post-traduccional sobre el residuo de cisteína catalítico, Cys²¹⁵. Esta cisteína se localiza en un entorno químico que hace que el grupo tiol se encuentre en forma de tiolato (R-S⁻) lo que incrementa su reactividad y la hace más susceptible a posibles modificaciones (Krishnan et al., 2011). Además de modular la actividad de algunas proteínas, también se ha demostrado que la S-sulfhidratación modifica la interacción entre proteínas, como ocurre con la interacción entre Keap1 y Nrf2 implicada en la respuesta antioxidante en ratones (Yang et al., 2013).

De forma similar a lo descrito en mamíferos, la investigación desarrollada por nuestro grupo ha demostrado que la S-sulfhidratación también se produce de forma fisiológica en plantas de *Arabidopsis* cultivadas en ausencia de estrés (Aroca et al., 2015). Un total de 106 proteínas sulfhidratadas fueron identificadas, algunas de las cuales habían sido previamente descritas en sistemas animales como la actina, la catalasa, la glutamina sintetasa (GS), la GAPDH y la β -tubulina, entre otras (Aroca et al., 2015). La S-sulfhidratación de la proteína GS produce una disminución de su actividad, en cambio, la GAPDH y la ascorbato peroxidasa (APX) ven incrementadas sus actividades cuando son sulfhidratadas. El tratamiento con ditioneitol (DTT) revierte estos efectos en las tres proteínas, lo que significa que la modificación llevada a cabo por el H₂S en estas enzimas es reversible y por tanto puede tener una función fisiológica (Aroca et al., 2015). Hemos demostrado además que la Cys³² de la

proteína APX citosólica es el residuo específico que sufre la modificación por S-sulfhidratación. Este residuo, que se localiza en el sitio activo, sufre otras modificaciones post-traduccionales como S-nitrosilación, glutationilación y oxidación, lo que sugiere que esta enzima debe estar finamente regulada en condiciones ambientales específicas (Aroca et al., 2015).

La detección selectiva de proteínas modificadas mediante S-sulfhidratación en mamíferos y en *Arabidopsis thaliana* se ha realizado empleando una versión modificada del “Biotin Switch Metod” (MBSM) utilizado para la detección de proteínas modificadas por S-nitrosilación (Sell et al., 2008; Mustafa et al., 2009). Sin embargo, debido a la controversia que ha surgido en relación con la especificidad del MSBM, se ha establecido un nuevo método para la detección de proteínas modificadas post-traduccionamente por S-sulfhidratación, el denominado “Tag-Switch Assay” (Zhang et al., 2014) (Figura 9).

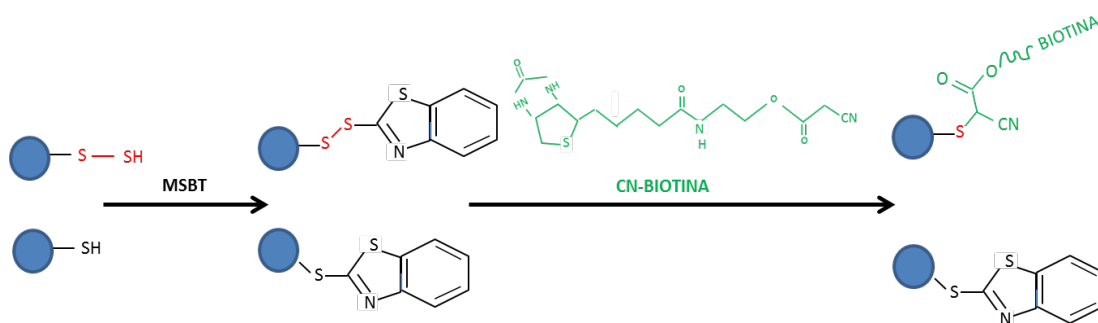


Figura 9: Representación esquemática del “Tag-Switch Assay” empleado para la detección de proteínas S-sulfhidratadas en esta Tesis.

En un primer paso, el agente bloqueante metilsulfonil benzotiazol (MSBT) reacciona con los grupos tioles y los grupos persulfuros, formando los correspondientes aductos bloqueados, que a su vez presentan diferentes reactividades. Los aductos formados a partir de grupos tiólicos son éteres de tioles, y los resultantes de la reacción con un grupo persulfuro son disulfuros, siendo estos últimos muy reactivos con determinadas moléculas nucleófilas derivadas del carbono, como el reactivo CN-biotina, que contiene un grupo cianoacetato. La CN-biotina no reacciona ni con puentes disulfuro establecidos entre dos cisteínas (R-S-S-R) ni con residuos S-nitrosotiol (R-SNO). Además, solo las proteínas con residuos persulfuros bloqueados por MSBT son posteriormente marcadas por la CN-biotina (Zhang et al., 2014). Una vez que las proteínas sulfhidratadas están unidas a la biotina, pueden llevarse a cabo dos procedimientos distintos para identificar dichas proteínas. Por un lado, mediante la realización de western-blot y detección inmunológica empleando anticuerpos frente a la biotina, puede determinarse el patrón de S-sulfhidratación en una condición específica o un fondo genético determinado. Por otro lado, las proteínas marcadas con biotina pueden ser purificadas empleando la técnica de

cromatografía de afinidad con estreptavidina y analizadas posteriormente mediante espectrometría de masas.

2.4. Funciones fisiológicas del H₂S

2.4.1. Mamíferos

Casi una década de estudio de la biología del H₂S en animales ha permitido conocer su implicación en la regulación de la homeostasis vascular y de la función neurológica principalmente; aunque también se ha relacionado a este nuevo gasotransmisor con otras funciones fisiológicas y ciertas patologías como la diabetes o la aterosclerosis.

En el sistema cardiovascular, la administración de concentraciones fisiológicas de H₂S protege a los vasos sanguíneos, disminuye el daño miocárdico, regula la presión sanguínea y limita la inflamación (Polhemus y Lefer, 2014). El H₂S actúa sobre las células del músculo liso que recubren los vasos sanguíneos produciendo un efecto vasodilatador (Kabil et al., 2014), y también sobre componentes celulares sanguíneos como las plaquetas y proteínas como el fibrinógeno, mostrando propiedades antiagregantes, antiadhesión y anticoagulantes (Nishikawa et al., 2013; Morel et al., 2014; Olas y Kontek, 2014). Los mecanismos de acción propuestos en la mediación de estos efectos son la S-sulfhidratación de determinadas proteínas presentes en las plaquetas o la disminución del anión superóxido y del calcio en estas mismas células.

En el sistema nervioso central, el H₂S está involucrado en la neuroprotección (Deng et al., 2014) y la neurotransmisión (Abe y Kimura, 1996). La aplicación de H₂S inhalado en ratones produce un efecto neuroprotector frente a la enfermedad de Parkinson (Kida et al., 2011). El H₂S protege a las neuronas de los procesos apoptóticos y degenerativos (White, 2012). Los mecanismos responsables parecen deberse a su función como antioxidante (Deng et al., 2014).

Otros efectos del sulfuro se han observado en las células β de los islotes pancreáticos, donde se ha identificado la expresión de la CSE, lo que sugiere que el H₂S desempeña un importante papel en la regulación de la secreción de insulina. La aplicación exógena de concentraciones fisiológicas de H₂S (Yang et al., 2005), así como del sustrato, L-cisteína (Kaneko et al., 2006), inhiben la liberación de insulina, vía activación de canales K_{ATP} de las células β . Los efectos del H₂S en las células pancreáticas podrían representar una herramienta terapéutica para la regulación del metabolismo de la insulina, así como para la homeostasis de la glucosa (Wang, 2012). Otra función destacada del H₂S es su papel protector frente a la aterosclerosis, gracias a la atenuación del estrés oxidativo, a la reducción de la actividad plaquetaria y a su efecto antiinflamatorio (Qiao et al., 2010; Mani et al., 2013; Olas y Kontek, 2014).

2.4.2. Plantas

La función que ejerce el sulfuro sobre los sistemas biológicos no es exclusiva de mamíferos y era cuestión de tiempo que fuera descrita la importancia de esta molécula señalizadora en otros organismos, como ha ocurrido en plantas. Así, en los últimos años se ha demostrado que el H₂S también regula procesos fisiológicos en el reino vegetal. Por un lado, multitud de trabajos han descrito la participación del sulfuro en la protección de las plantas frente a diferentes estreses abióticos y bióticos, y por otro, se ha demostrado que es una importante molécula señal que participa en la regulación de procesos esenciales para la planta.

Las plantas están expuestas constantemente a una gran variedad de estreses abióticos y bióticos y debido a su naturaleza sésil necesitan disponer de unos mecanismos muy precisos de mantenimiento de la homeostasis celular. Los estreses abióticos responsables de la baja productividad de los cultivos y de la mayor parte de las pérdidas en las cosechas son la presencia de metales pesados, la salinidad, la sequía y las temperaturas extremas. Así mismo, la productividad de los cultivos también se ve afectada por la presencia y el establecimiento de infecciones y plagas producidas por diferentes organismos biológicos, lo que se conoce como estrés biótico. El sulfuro participa en los mecanismos adaptativos de las plantas frente a estos tipos de estreses.

- **Metales pesados y otros estreses iónicos**

Los metales pesados ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Schutzendubel y Polle, 2002). Diversos estudios han demostrado que el H₂S alivia los efectos tóxicos derivados de la exposición a estos metales no esenciales. La exposición a cadmio (Cd) produce una acumulación excesiva de ROS en plantas de chopo (*Populus euphratica*), lo que genera un importante daño que culmina con la muerte celular programada. El pretratamiento con NaSH alivia la toxicidad producida por Cd mediante el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión reductasa (GR) y mediante la reducción de la acumulación de Cd en el citoplasma, limitando su entrada en la célula y promoviendo su ingreso en las vacuolas (Sun et al., 2013).

Aunque es esencial para las plantas, el boro en exceso produce una inhibición significativa del desarrollo de la raíz en plantas de pepino (*Cucumis sativus*). El pretratamiento con NaSH suprime este efecto negativo a través de la regulación de genes implicados en la biosíntesis de la pared celular (Wang et al., 2010).

El estrés oxidativo generado por la presencia de cobre en plantas de trigo (*Triticum sativum*) afecta a la germinación de las semillas. Un estudio llevado a cabo por Zhang et al. ha revelado que de forma análoga a lo descrito en el caso del Cd, el pretratamiento con NaHS incrementa la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa y la SOD, mejorando de esta forma la germinación de las semillas (Zhang et al., 2008).

Recientemente han sido descritos los efectos positivos del H₂S en el ápice radicular de plantas de mijo (*Setaria italica*) sometidas a estrés por cromo. El sulfuro disminuye la acumulación de este metal en las plantas reprimiendo los genes que codifican proteínas responsables de la internalización del cromo en las células e induciendo aquellos genes responsables de la expulsión del metal (Huihui et al., 2014). Singh et al. ha demostrado que el H₂S y el NO están implicados en la mitigación de los efectos negativos derivados de la exposición a arsénico en plantas de guisante (*Pea sativum*) (Singh et al., 2015).

- **Estrés salino**

La salinidad de los suelos es un factor limitante que repercute en la germinación de las semillas, el crecimiento de las plantas y en definitiva en la productividad de los cultivos (Ferreira-Silva et al., 2011). La elevada salinidad del terreno produce un desequilibrio iónico y de la homeostasis redox en las plantas, lo que se traduce en un incremento en el contenido de ROS y en la generación de daño oxidativo. La aplicación exógena de H₂S en plantas de maíz (*Zea mays*) alivia el estrés oxidativo provocado por la sal mediante el aumento de la actividad de las enzimas dehidroascorbato reductasa (DHAR) y GR, implicadas en el metabolismo del ácido ascórbico y del GSH (Shan et al., 2013). En plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), el pretratamiento con NaHS produce una inducción de la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD, la catalasa y la guaiacol peroxidasa (GPX). Este aumento de la tolerancia a sal provocado por el H₂S requiere además de la presencia de NO, ya que el tratamiento simultáneo con agentes neutralizantes (“scavengers”) del NO, como el cPTIO, bloquean el efecto beneficioso observado (Wang et al., 2011). Además de inducir los sistemas antioxidantes de la planta, el sulfuro mejora la resistencia a la sequía mediante el restablecimiento del equilibrio iónico celular. En raíces de *A. thaliana* el NaHS regula el sistema de antiporte Na⁺/K⁺ de la membrana plasmática restituyendo la homeostasis iónica alterada por el estrés salino (Li et al., 2013).

- **Sequía**

La sequía es uno de los estreses más importantes a los que se enfrentan las plantas a lo largo de su ciclo de vida. La distribución mundial de las distintas especies vegetales y la productividad de la mayoría de los cultivos dependen de la disponibilidad de agua.

Las plantas de *Arabidopsis* expuestas a limitación de agua presentan una inducción de genes asociados a la respuesta a sequía como *DREB2A*, *DREB2B*, *CBF4* y *RD29A*, así como del transcrito del gen *L-CDES* (At3g62130), que codifica una proteína con actividad L-cisteína desulfhidrasa. La fumigación de plantas con NaHS revierte esta inducción y provoca un aumento en la tasa de supervivencia de las plantas y una disminución de la apertura de los estomas (Jin et al., 2011). Además, se sabe que el sulfuro modula la expresión de microRNAs que intervienen en la respuesta adaptativa de la planta frente a la sequía, lo que se traduce en una mayor tolerancia al estrés (Shen et al., 2013).

Un estudio más reciente pone de manifiesto los efectos beneficiosos del H₂S y otras moléculas sobre plantas de césped (*Cynodon dactylon*) expuestas a diferentes estreses abióticos, incluida la sequía. Estos efectos se atribuyen a una mayor acumulación de moléculas osmoprotectoras y antioxidantes, así como a la inducción de factores de transcripción y la activación de vías de traducción de señales que conducen al incremento de la tolerancia de la planta (Chan y Shi, 2015).

- **Estrés por calor**

Las altas temperaturas es otro factor que limita el rendimiento y la productividad de las cosechas. El H₂S interviene en la tolerancia al estrés por calor, tal como ha sido demostrado en varias investigaciones. En cultivos celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) sometidos a estrés térmico, el pretratamiento con NaHS aumenta el porcentaje de supervivencia de las células y este efecto está mediado por calcio (Li et al., 2012). El aumento de la tolerancia al estrés térmico por H₂S en plantas de maíz (*Zea mays* L.) se produce por una disminución en el contenido de malondialdehído (MDA), indicador del daño oxidativo en las células, como consecuencia de una acumulación de prolina. Estos efectos se traducen en un mayor porcentaje de germinación de las semillas y una mayor supervivencia de las plantas expuestas al estrés (Li et al., 2013).

- **Estreses bióticos**

La resistencia de las plantas frente a determinados patógenos y enfermedades está relacionada con el estado nutricional de azufre de las mismas. A este fenómeno se le conoce como resistencia inducida por azufre (SIR: “sulfur-induced resistance”) o defensa potenciada por azufre (SED: “sulfur-enhanced defense”) (Bloem et al., 2007). Existen múltiples mecanismos que contribuyen al efecto positivo del azufre en la salud de las plantas, que incluyen la síntesis de GSH y de otros compuestos azufrados importantes en la defensa de las plantas, como los glucosinolatos en las Brasicáceas y las aliinas en la cebolla y el ajo.

Además de estas moléculas, en la SIR interviene también el H₂S. Las emisiones de H₂S por diferentes especies de plantas se correlacionan inversamente con la infección por hongos. Además, la actividad L-cisteína desulfhidrasa, y con ello la producción de H₂S, se induce en plantas infectadas y es mayor en aquellas plantas cultivadas con un aporte suficiente de azufre (Bloem et al., 2004; Bloem et al., 2011; Bloem et al., 2012).

Como se ha descrito anteriormente, se ha demostrado que el sulfuro es una importante molécula señal que participa en la regulación de otros procesos esenciales para las plantas además de las respuestas a estrés, tal como se describen a continuación.

- **Germinación**

Conseguir una germinación rápida y uniforme es uno de los retos de la agricultura. El H_2S mejora la germinación de las semillas no solo bajo condiciones de estrés, sino también en condiciones fisiológicas. El tratamiento de las semillas de *Jatropha curcas* con H_2O_2 mejora el porcentaje de germinación e incrementa la actividad L-cisteína desulfhidrasa, que a su vez induce la producción de H_2S . Por el contrario, el pretratamiento con ácido aminooxiacético (AOA), un inhibidor de la biosíntesis de H_2S , revierte estos efectos producidos por el H_2O_2 . La aplicación exógena de H_2S también aumenta el porcentaje de germinación de las semillas de *J. curcas* (Li et al., 2012). Dooley et al. describen un efecto similar del H_2S en la germinación de las semillas de diferentes especies vegetales. La exposición de semillas de judía (*Phaseolus vulgaris*), guisante (*Pisum sativum*), trigo (*Triticum aestivum* L.) y maíz (*Zea mays* L.) a bajas concentraciones de H_2S en solución, aumenta el porcentaje de germinación y disminuye el tiempo necesario para que este proceso tenga lugar, y además de esto, produce un incremento de la biomasa de estos cultivos (Dooley et al., 2013).

- **Movimiento estomático**

Otro proceso clave en el desarrollo de la planta donde participa el sulfuro es el movimiento estomático. Los estomas son pequeños poros presentes en la superficie de las hojas que permiten el intercambio gaseoso entre la planta y la atmósfera. Gracias al movimiento de las dos células guarda que lo forman, el estoma puede abrirse o cerrarse en respuesta a determinados estímulos. Los estomas juegan un papel crucial durante la fotosíntesis, la transpiración y la tolerancia a la sequía (Hetherington y Woodward, 2003; Chaerle et al., 2005).

El efecto del sulfuro sobre el movimiento estomático ha generado cierta controversia debido a la obtención de resultados opuestos en los estudios realizados. Uno de estos estudios concluye que el pretratamiento con moléculas donadoras de sulfuro produce la apertura estomática en plantas de *A. thaliana* y *Capsicum annuum* (Lisjak et al., 2010; Lisjak et al., 2011).

Sin embargo, otros grupos de investigación han demostrado el efecto opuesto, el cierre estomático. Los trabajos, realizados con diferentes especies vegetales como *Vicia faba*, *A. thaliana* e *Impatiens walleriana*, demuestra la implicación del H_2S en el cierre estomático. Además, en presencia de hipotaurina, un agente neutralizante del sulfuro, el cierre estomático mediado por ácido abscísico (ABA) se ve reducido, lo que indica que el H_2S participa en la ruta de señalización por ABA, presumiblemente mediante la regulación de los transportadores ABC (“ATP-binding cassette”) presente en las células guarda (García-Mata y Lamattina, 2010).

Muy recientemente, el uso de los mutantes *des1* ha permitido profundizar en el estudio de la participación del sulfuro generado por DES1 y su relación con el NO en la ruta de señalización por ABA en células guarda. Los mutantes *des1* son incapaces de cerrar sus estomas en presencia de ABA, pero la aplicación exógena de sulfuro o la complementación genética

reverten este fenotipo. Mediante el empleo de diferentes mutantes afectados en la percepción y señalización por ABA, se concluyó que el sulfuro actúa aguas abajo del receptor de ABA y que DES1 es necesaria para la producción de NO dependiente de ABA. DES1 es por tanto un nuevo componente en la cascada de señalización por ABA en células guarda, en la cual el NO interviene aguas abajo del sulfuro en el cierre estomático (Scuffi et al., 2014).

- **Fotosíntesis**

Como se ha descrito en el apartado anterior, el sulfuro promueve la apertura estomática en varias especies de plantas, lo que indirectamente tiene un efecto positivo sobre la fotosíntesis (Wang, 2012). Otros autores han puesto de manifiesto el papel del sulfuro en la modulación de la fotosíntesis en plantas de espinaca (*Spinacia oleracea*). Los resultados de este trabajo concluyen que el tratamiento con NaHS produce un incremento en el contenido de clorofila de las hojas así como un mayor número de granas en los cloroplastos. Las plantas tratadas presentan también una mejora de determinados parámetros fotosintéticos, alcanzándose en algunos casos sus niveles máximos; y exhiben una mayor expresión y actividad de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (RuBisCO) y de enzimas relacionadas con la modificación redox (Chen et al., 2011).

- **Organogénesis y elongación de la raíz**

La organogénesis está regulada por la interacción de diferentes factores genéticos y hormonales. La aplicación de NaHS a plántulas cortadas de boniato (*Ipomoea batatas* L.) produce un aumento del número y la longitud de las raíces adventicias generadas y este efecto es dependiente de la dosis. Estos resultados ponen de manifiesto la implicación del sulfuro en este importante proceso y la interconexión existente entre esta molécula y otras moléculas señalizadoras como la auxina ácido indolacético (IAA) y el NO (Zhang et al., 2009). En otro estudio se describe un aumento en la formación de raíces adventicias en plantas de pepino (*Cucumis sativus*) tratadas con NaHS (Lin et al., 2012). Este efecto es el resultado de un incremento tanto de la expresión génica como de los niveles de la proteína hemo oxigenasa-1(HO), un componente de la ruta de señalización por auxinas implicado en dicho proceso (Xuan et al., 2008).

- **Senescencia y post-cosecha**

El H₂S provoca un retraso de la senescencia en las plantas, y de nuevo, la disminución del estrés oxidativo a través de la inducción de los sistemas antioxidantes parece ser el mecanismo de acción. El pretratamiento con NaHS retrasa la senescencia, la abscisión y el oscurecimiento de flores de diferentes especies como *Erigeron annuus*, *Hibiscus syriacus* L. o *Rosa chinensis* Jacq, entre otras (Zhang et al., 2011). Este estudio también determina que el contenido en MDA se correlaciona de forma opuesta con la concentración endógena de H₂S en los explantos. Otro trabajo posterior ha demostrado un efecto similar del NaHS en frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) recolectados. La fumigación con sulfuro prolonga la vida útil y retrasa la senescencia

de los frutos mediante la mejora de las defensas antioxidantes y la regulación de diferentes actividades enzimáticas que influyen en la calidad del fruto una vez cosechado (Hu et al., 2012).

- **Autofagia**

Un proceso común en animales y plantas donde el sulfuro juega un importante papel regulador es la autofagia. La autofagia es un proceso catabólico en el cual se degradan los componentes celulares para garantizar el reciclaje eficiente de los nutrientes, especialmente durante situaciones de limitación nutricional. Este proceso se detalla en mayor profundidad en el siguiente capítulo de la Introducción de esta Tesis Doctoral.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado por primera vez que el sulfuro actúa como un regulador negativo del proceso de autofagia en plantas (Gotor et al., 2013). Las mutaciones en el gen *DESI* disminuyen la producción de sulfuro en el citosol y dan lugar a la acumulación y lipidación de las isoformas ATG8 en *Arabidopsis*, un rasgo característico de la inducción de la autofagia. La aplicación exógena de sulfuro o la complementación genética de la mutación, eliminan las diferencias fenotípicas observadas entre los mutantes y las plantas silvestres, eliminando de esta manera la activación de la autofagia. La adición de sulfuro de forma exógena también suprime la inducción de la autofagia causada por privación de carbono en plantas silvestres (Álvarez et al., 2012b). En mamíferos, un estudio con células de colon ha demostrado, por el contrario, que el H₂S produce una inducción de la autofagia con fines protectores a través de la regulación de la ruta AMPK/mTOR (Wu et al., 2012). Sin embargo, otras dos investigaciones describen un efecto opuesto, la inhibición de la autofagia por el H₂S (Wang et al., 2012; Talaei et al., 2013). Los tres estudios han sido llevados a cabo analizando diferentes tejidos y enfermedades, y puede que el efecto de sulfuro sobre la autofagia sea específico de cada tipo celular.

Durante esta Tesis Doctoral se ha profundizado en el estudio del papel del sulfuro como regulador negativo de la autofagia. Para ello, se ha establecido un nuevo sistema experimental en el cual la autofagia se induce por una condición diferente, en un tejido diferente y es analizada empleando distintas herramientas moleculares de las utilizadas hasta entonces en nuestro laboratorio (Laureano-Marín et al., 2016). Además, se ha propuesto un mecanismo para dicha regulación.

3. Autofagia en plantas

La autofagia (del griego *auto*-a uno mismo; *phagein*-comer) es un mecanismo universal presente en células eucariotas que consiste en la digestión del contenido celular para la eliminación de componentes celulares dañados o tóxicos así como para el reciclaje de nutrientes. Es un proceso constitutivo, lo que significa que tienen lugar a nivel basal en las células en condiciones normales y cuyo fin es el mantenimiento de la homeostasis celular. Sin

embargo, este proceso es inducido bajo determinadas condiciones de estrés abiótico como la limitación de nutrientes, la salinidad o la sequía. Además la autofagia interviene en distintos procesos fisiológicos de la planta como la senescencia, la muerte celular programada (PCD) o la respuesta inmune (Patel et al., 2006; Xiong et al., 2007a; Lv et al., 2014).

En plantas se han descrito dos tipos de autofagia, la microautofagia y la macroautofagia (Figura 10). En la microautofagia, parte del citoplasma es atrapado mediante la invaginación del tonoplasto, generando de esta forma una pequeña vesícula intravacuolar denominada cuerpo autofágico. La ruptura de la membrana de este cuerpo autofágico expone su contenido a las hidrolasas vacuolares que incluyen una gran variedad de proteasas ácidas y peptidasas, así como nucleasas, lipasas y glucanasas. Este tipo de autofagia ha sido descrito durante la senescencia foliar y durante el desarrollo y la germinación de las semillas (Bassham et al., 2006; van Doorn y Papini, 2013).

En plantas, como en otros organismos, la macroautofagia supone la formación *de novo* de autofagosomas, vesículas de doble membrana que contienen componentes citoplasmáticos (Bassham, 2007). Los autofagosomas son transportados hasta la vacuola donde se internalizan a través de la fusión de su membrana externa con el tonoplasto. Una vez dentro de la vacuola, los cuerpos autofágicos compuestos por su membrana interna y el contenido celular son degradados por las hidrolasas vacuolares (Liu y Bassham, 2012). Los productos de degradación son exportados desde la vacuola al citoplasma para su posterior reutilización, pero se conoce muy poco acerca de este proceso en plantas (Mizushima, 2007; Lv et al., 2014).

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha estudiado exclusivamente el proceso de macroautofagia, que de aquí en adelante será citado simplemente como autofagia.

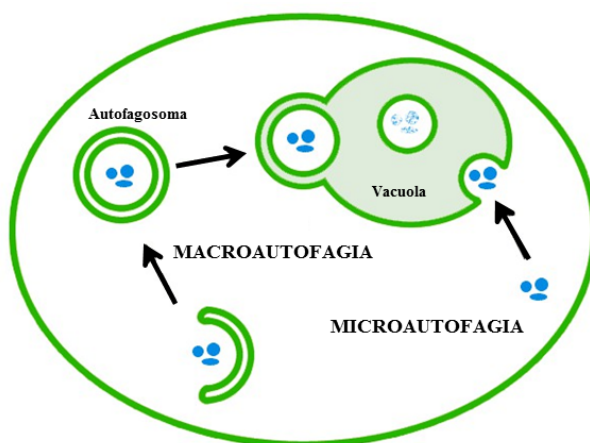


Figura 10: Representación esquemática de la microautofagia y la macroautofagia en plantas.

3.1. Maquinaria molecular de la autofagia

Los genes que participan en el proceso de autofagia son conocidos como genes *ATG* (*AuTofaGía*) y fueron descritos por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante el estudio de mutantes cuyas células presentaban una escasa o nula acumulación de cuerpos autofágicos cuando eran sometidas a limitación nutricional (Tsukada y Ohsumi, 1993). En levaduras se han descrito 40 genes *ATG* y muchos están conservados y presentan ortólogos en mamíferos y plantas. La mayoría de los principales grupos de genes *ATG* han sido identificados en plantas y sus funciones son similares a los de levadura aunque algunos de estos genes en plantas forman parte de familias génicas y no están presentes en una sola copia, como ocurre con la totalidad de los genes *ATG* de levaduras (Liu y Bassham, 2012; Lv et al., 2014).

Las proteínas codificadas por los genes *ATG* esenciales para la formación de los autofagosomas pueden dividirse en cinco grupos funcionales: el complejo quinasa ATG1, el complejo fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), el complejo ATG9 y dos sistemas similares a los de ubiquitinación (“ubiquitination-like”) (Xie y Klionsky, 2007). Además, el proceso de autofagia puede ser diseccionado en una serie de etapas que incluyen la iniciación, nucleación de la vesícula, expansión del fagóforo y cierre del autofagosoma, transporte y fusión con la vacuola, y por último digestión y reciclaje del contenido (Figura 11) (Thompson y Vierstra, 2005a; Yoshimoto et al., 2010).

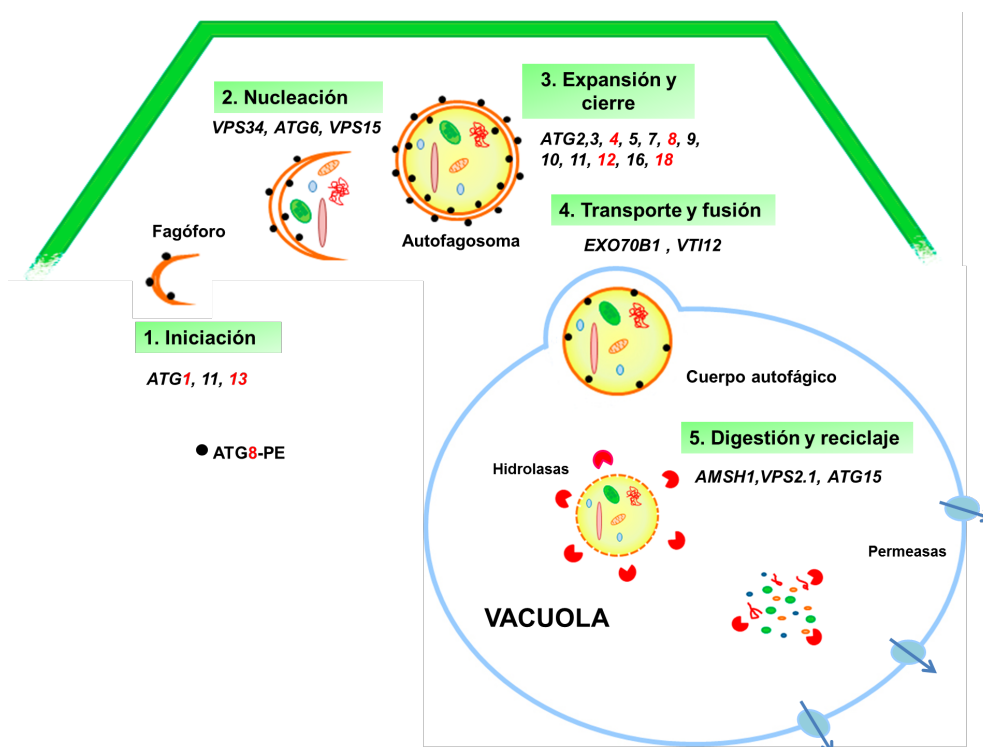


Figura 11: Representación esquemática de la autofagia en *Arabidopsis*. En cada una de las etapas se indican los genes implicados. En color negro están representados los genes de copia única y en color rojo los que pertenecen a una familia génica. La versión lipídica de la proteína ATG8, que en la figura aparece representada como un círculo negro, participa en todas las etapas del proceso autofágico.

- **Iniciación:** en esta etapa interviene el complejo quinasa ATG1 formado por las proteínas ATG1 y ATG13, implicado en la activación y regulación del proceso de autofagia. En levaduras y mamíferos, el complejo ATG1 está regulado por la proteína TOR (“Target Of Rapamycin”) situada aguas arriba. TOR es una serín-treonín quinasa que coordina procesos relacionados con nutrición, energía y estrés (Wullschleger et al., 2006; Laplante y Sabatini, 2012; Robaglia et al., 2012; Dobrenel et al., 2013). TOR actúa como un regulador negativo del proceso de autofagia en levaduras, mamíferos y organismos fotosintéticos (Díaz-Troya et al., 2008; Liu y Bassham, 2010). En condiciones óptimas de aporte nutricional, TOR se encuentra activo y reprime la actividad del complejo ATG1-ATG13 mediante la hiperfosforilación de ATG13, lo que evita la interacción con ATG1. La inhibición de TOR por limitación de nutrientes desencadena una defosforilación de ATG13 que incrementa la afinidad de ésta por ATG1. La asociación ATG1-ATG13 produce la autofosforilación y activación de ATG1, promoviendo la autofagia (Codogno, 2004).

En *Arabidopsis*, han sido identificados tres genes homólogos de ATG1 y dos de ATG13 y se ha demostrado la implicación de ambas proteínas en la regulación de la autofagia por limitación de nutrientes (Suttangkakul et al., 2011). Sin embargo, en plantas no se ha determinado que exista una regulación negativa de la autofagia a través de la interacción de TOR con el complejo ATG1/ATG13. Estudios recientes han puesto de manifiesto que el complejo ATG1-ATG13 se une al fagóforo o estructura pre-autofágica (PAS) mediante la interacción de ATG1 con ATG8. Esta unión es posible por la existencia de un motivo de interacción con ATG8 (AIM) presente en ATG1. Otra proteína que participa en esta etapa es ATG11. Se ha demostrado que ATG11 se une a ATG13 y a ATG8, posiblemente a través de un AIM presente en su secuencia. Ambas interacciones, ATG1-ATG8 y ATG11-ATG8 podrían tener dos consecuencias: una sería dirigir a ATG1 hacia el fagóforo para promover la maduración y el transporte de la vesícula, y la otra sería provocar la degradación de ATG1 (y posiblemente del complejo ATG1-ATG13 completo) lo que permitiría la regulación dinámica del proceso de autofagia en función del estado nutricional de la planta (Suttangkakul et al., 2011; Li et al., 2014; Li y Vierstra, 2014).

- **Nucleación:** en levaduras, el complejo PI3K es necesario para la nucleación del fagóforo (primera etapa de la formación del autofagosoma). Este complejo proteico formado por

VPS34/ATG6/VPS15 interviene en la acumulación de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) en el fagóforo. La actividad quinasa reside en la proteína VPS34, mientras que el resto de las proteínas poseen una función reguladora. La principal función del complejo PI3K es generar PI3P en el PAS. El motivo por el que es necesario el PI3P no se conoce aún, pero una posibilidad es que éste ayude a diferenciar el fagóforo en desarrollo de otros compartimentos endomembrana durante el ensamblaje, y así proporcionar una marca que sea reconocida por la maquinaria que fusiona los autofagosomas con el tonoplasto (Xie y Klionsky, 2007).

En *Arabidopsis* solo ha sido identificada una proteína PI3K, AtVPS34, que posee diferentes funciones en plantas y que es esencial para el desarrollo del polen y para la reorganización de la vacuola (Welters et al., 1994; Leshem et al., 2007; Lee et al., 2008). ATG6 también ha sido identificada y estudiada en *Arabidopsis* y se sabe que se expresa de forma ubicua en toda la planta y que co-localiza con ATG8 en los autofagosomas. ATG6 está implicada en la formación del polen y en la limitación de la infección por patógenos (Fujiki et al., 2007; Patel y Dinesh-Kumar, 2008). Hay solo un homólogo de *VSP15* en *Arabidopsis*, pero su función no ha sido caracterizada en detalle (Avin-Wittenberg et al., 2012).

- **Expansión del fagóforo y cierre del autofagosoma:** la proteína transmembrana ATG9 participa en el reclutamiento de los lípidos procedentes de la etapa anterior para la expansión del fagóforo (Yamamoto et al., 2012). Estudios en levaduras han demostrado la existencia de dos poblaciones de ATG9 dentro de la célula, una localizada en el PAS y otra cerca de la mitocondria, en un conjunto de vesículas y túbulos que derivan de la ruta secretora. Esta segunda localización, conocida como no PAS, podría ser el lugar de origen de las membranas necesarias para la expansión del fagóforo y ATG9 oscila entre ambas localizaciones (Mari et al., 2010). Junto con ATG9, participan las proteínas ATG2 y ATG18 que permiten el reciclaje de ATG9 (Reggiori et al., 2004).

Los componentes del complejo ATG9 están conservados en *Arabidopsis*. La mutación de pérdida de función de *ATG9* en *A. thaliana* provoca defectos en el proceso autofágico en condiciones de limitación nutricional produciendo una aceleración de la clorosis foliar y de la senescencia (Hanaoka et al., 2002). De igual forma, las mutaciones en los genes *ATG2* y *ATG18* conllevan un bloqueo de la autofagia, lo que pone de manifiesto la importancia de estos genes en este proceso, presumiblemente durante la formación del autofagosoma (Xiong et al., 2005; Inoue et al., 2006).

Además, los dos sistemas similares a los de ubiquitinación ATG7-ATG10 y ATG7-ATG3, participan también en la elongación y cierre de la estructura que culmina con la formación del autofagosoma y son las proteínas ATG más estudiadas en plantas (Thompson y Vierstra, 2005a; Bassham, 2007). Mediante una cascada de conjugaciones dependientes de ATP, una enzima activadora tipo E1 y una enzima conjugadora tipo E2 unen ATG12 a ATG5 y ATG8 al lípido fosfatidiletanolamina (PE) (Figura 12). La conjugación es iniciada por el sistema ATG7-

ATG10, donde la proteína ATG7 (E1) primero adenila un residuo de glicina localizado en el extremo carboxilo de ATG12 para después formar un enlace tioéster con un residuo de cisteína presente en ATG7. La proteína ATG12, una vez activada, es transferida desde ATG7 a la proteína ATG10 (E2) mediante transesterificación, antes de la conjugación final con ATG5 mediante la formación de un enlace amida entre la glicina del extremo carboxilo terminal de ATG12 y una lisina conservada en ATG5. El conjugado ATG12-ATG5 se asocia con el fagóforo mediante la proteína dimérica ATG16, y el complejo hexamérico resultante dirige después la lipidación de ATG8 actuando como una E3 ligasa. El segundo sistema de ubiquitinación es más atípico ya que el producto final de la conjugación contiene al lípido PE. En este caso, la proteína ATG8 es sintetizada como un precursor que requiere el procesamiento por parte de la cisteín proteasa ATG4 para exponer un residuo de glicina presente en su extremo carboxilo a la enzima ATG7 (E1). Una vez procesado por ATG4, ATG8 es activado por ATG7 y transferido hasta un residuo de cisteína presente en ATG3 que actúa como una E2. Finalmente es conjugado con el lípido PE mediante un enlace amida donde interviene el complejo descrito anteriormente, compuesto por ATG12-ATG5/ATG16 (Li y Vierstra, 2012).

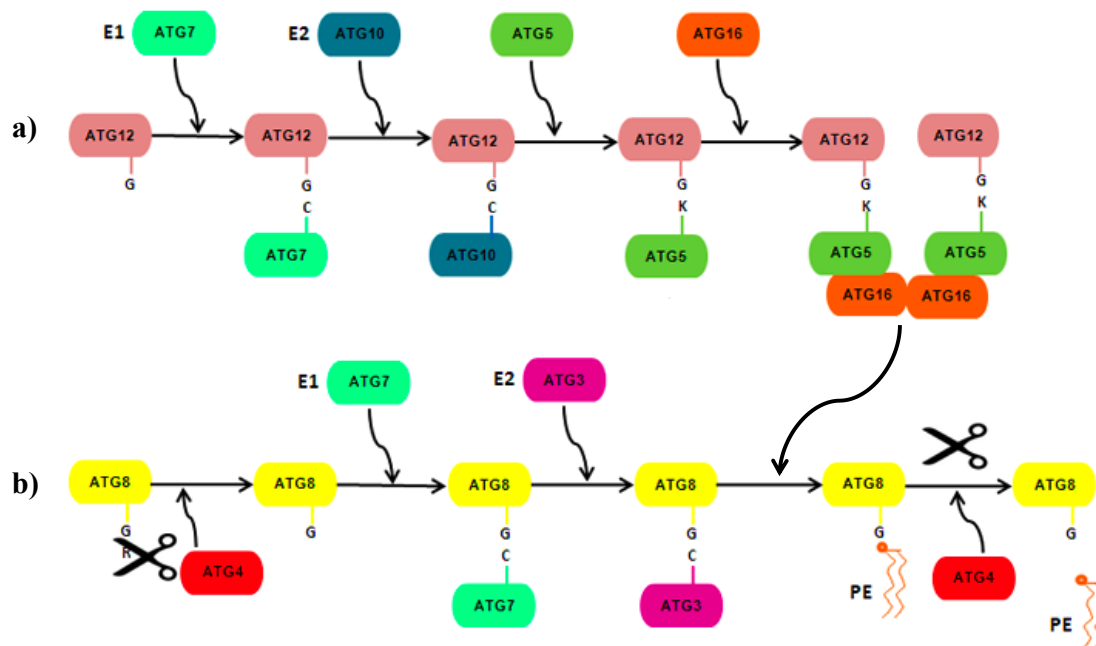


Figura 12: Sistemas de conjugación similares a los de ubiquitinación. a) Sistema de conjugación de la proteína ATG12. b) Sistema de conjugación de la proteína ATG8. Los detalles de su acción están descritos en el texto.

La proteína ATG8 unida a PE se localiza en la superficie de la membrana del fagóforo mientras que el multímero ATG12-ATG5/ATG16, junto con el resto del PAS, se disocia tras la formación del autofagosoma (Figura 13). Por tanto, ATG8 en su forma lipidada (ATG8-PE) es la única proteína autofágica que permanece unida al autofagosoma una vez completada su

formación, lo que hace de esta proteína una herramienta útil para el estudio y seguimiento de este proceso en diferentes organismos. La proteína ATG8-PE localizada en la membrana externa del autofagosoma puede ser desconjugada mediante la acción de ATG4, lo que produce la liberación de ATG8 que de esta forma puede participar en la formación de nuevos autofagosomas. Por su parte, la ATG8-PE presente en la membrana interna de la vesícula autofágica es degradada en la vacuola (Kirisako et al., 2000).

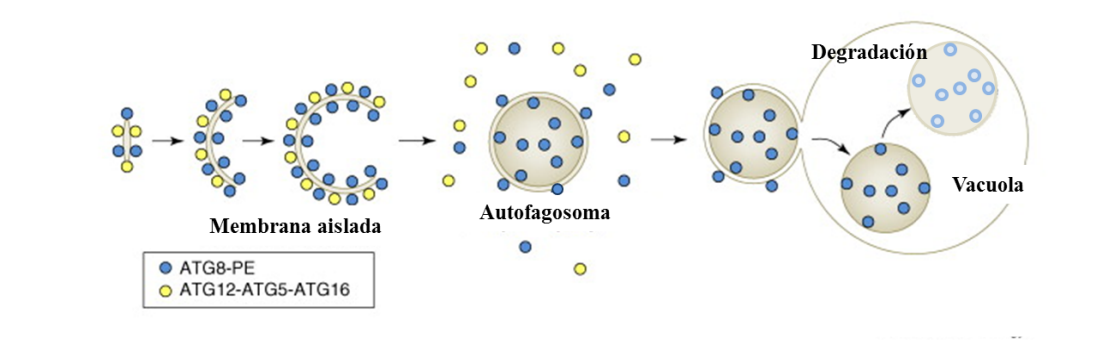


Figura 13: Localización de los dos sistemas de conjugación similares a los de ubiquitinación durante el proceso de formación del autofagosoma y fusión con la vacuola (Miura y Hasegawa, 2010).

En el genoma de levaduras, el gen *ATG8*, al igual que el resto de genes *ATG*, se encuentra en copia única. En mamíferos y en *A. thaliana* existen, sin embargo, ocho y nueve isoformas distintas de ATG8, respectivamente (Doelling et al., 2002; Yoshimoto et al., 2004). Las proteínas ATG8 de mamíferos se dividen fundamentalmente en dos subfamilias en función de sus homologías de secuencia. Estas subfamilias son la LC3 (“Light Chain 3”), formada por cuatro miembros y la GABARAP/GATE-16 (“GABA receptor-associated protein/Golgi associated ATPase enhancer of 16 kDa”), que incluye a otros cuatro componentes (Weidberg et al., 2010). Las isoformas ATG8 de *A. thaliana* presentan una homología de secuencia con la proteína de levadura de entre el 73 y el 90%. Las nueve isoformas albergan en su secuencia el residuo de glicina en el extremo C-terminal necesario para el procesamiento por parte de ATG4. Se dividen en tres subfamilias, la primera de ellas formada por las isoformas AtATG8a, AtATG8c, AtATG8d y AtATG8f; la segunda subfamilia contiene a AtATG8b, AtATG8e y AtATG8g y dentro del tercer grupo se encuentran AtATG8h y AtATG8i (Doelling et al., 2002). AtATG8h y AtATG8i se diferencian del resto de AtATG8s en que carecen de residuos extras en el extremo C-terminal después del residuo de glicina.

El motivo de la existencia de un gran número de proteínas ATG8 tanto en mamíferos como en plantas no se conoce aún, pero podría deberse a que las diferentes isoformas de ATG8 posean funciones específicas en una etapa concreta del desarrollo del autofagosoma o durante una determinada condición de estrés. Esto se ha demostrado en mamíferos, donde cada

subfamilia interviene en una fase de la formación del autofagosoma, y así, la subfamilia LC3 está implicada en la elongación del fagóforo mientras que los miembros de la subfamilia GABARAP/GATE-16 intervienen en la fase de maduración del autofagosoma (Weidberg et al., 2010). Aunque en *A. thaliana* las nueve isoformas de ATG8 se expresan en todos los tejidos de la planta y a lo largo de todo el desarrollo, existen diferencias en dicha expresión dependiendo del órgano o tejido estudiado. Las raíces, flores y silicuas son los órganos que presentan un mayor nivel de expresión de los genes *ATG8* y una mayor acumulación de sus proteínas, aunque la presencia relativa de las diferentes ATG8 observada difiere entre ellos. En un mismo tejido, también se observan diferencias en la expresión dependiendo de la zona, como ocurre en las raíces. La expresión de la mayoría de ATG8s alcanza el nivel máximo a las 4 semanas de crecimiento, etapa que precede a la floración, y disminuye progresivamente a partir de este momento. Por otro lado, en condiciones de limitación nutricional, todos los genes *ATG8* se inducen, pero esta inducción varía en función de la isoforma en cuestión y del tipo de limitación nutricional a la que se enfrenta la planta (Yoshimoto et al., 2004; Slavikova et al., 2005; Thompson et al., 2005b).

También se ha descrito que algunas de las proteínas ATG8 pueden estar implicadas en procesos no relacionados directamente con la autofagia, como el tráfico intracelular o la unión al citoesqueleto (Mann y Hammarback, 1994; Wang et al., 1999; Ketelaar et al., 2004).

- **Transporte y fusión con la vacuola:** recientemente se ha demostrado que EXO70B1, una proteína que participa en el proceso de exocitosis en plantas, interviene también en el transporte de los autofagosomas hasta la vacuola (Kulich et al., 2013). Por otro lado, la proteína SNARE VTI12 podría participar en la fusión del autofagosoma con el tonoplasto (Surpin et al., 2003).

- **Degradación del contenido y reciclaje:** en el lumen de la vacuola, lipasas como ATG15 en levadura degradan las membranas autofágicas y posteriormente el contenido es catabolizado por enzimas líticas. La enzima de-ubiquitinadora AMSH1 y la subunidad VPS2.1 del complejo ESCRT-III participan también en esta última etapa del proceso autofágico en *Arabidopsis* (Katsiarimpa et al., 2013). Los productos de degradación obtenidos en la vacuola pasan al citosol para ser reutilizados (Kim et al., 2007).

3.2. Regulación de la autofagia

Debido a la importancia fisiológica de la autofagia para la supervivencia celular, es necesaria la existencia de mecanismos que regulen la activación del proceso y que permitan a los organismos adaptarse al estrés y a las señales extracelulares. Los niveles de autofagia deben ser por tanto controlados con precisión para evitar ciclos fútiles y con ello la disfunción celular (He y Klionsky, 2009).

3.2.1. Regulación por la vía TOR

En levaduras y mamíferos, el estado nutricional es detectado y transducido a través de dos rutas de señalización bien caracterizadas, la de TOR y la de la proteína kinasa A (PKA), que regulan negativamente el proceso de autofagia (He y Klionsky, 2009).

El regulador central de la autofagia en estos organismos es TOR, una serín/treonín quinasa que pertenece a la familia de las fosfatidilinositol quinastas y que se encuentra conservada en los eucariotas (Díaz-Troya et al., 2008). TOR integra la información procedente de diferentes rutas de señalización situadas aguas arriba. En *S.cerevisiae* y mamíferos, forma dos complejos señalizadores física y funcionalmente distintos, el complejo TOR1 (TORC1) y el complejo TOR2 (TORC2). Mientras que TORC2 regula los aspectos espaciales del crecimiento celular a través de la regulación de la polarización de los filamentos de actina del citoesqueleto, TORC1 promueve el crecimiento celular mediante la regulación de la síntesis de proteínas y la inhibición de la autofagia. TORC1 es regulado por una gran variedad de señales intra- y extracelulares, como factores de crecimiento, la disponibilidad de nutrientes y los niveles de ATP.

Estudios iniciales en levaduras identificaron a la rapamicina, un compuesto antifúngico e inmunosupresor, como inhibidor de TOR. La inhibición de TOR por rapamicina conduce a una inducción del proceso autofágico, incluso en condiciones nutricionales óptimas. Esto ha permitido profundizar en el estudio y comprensión del mecanismo regulador que ejerce TOR sobre este proceso catabólico en condiciones de escasez de nutrientes. La inactivación de TORC1 induce la autofagia mediante la regulación negativa de la asociación entre las proteínas autofágicas ATG1y ATG13. El papel específico de TORC1 es mantener a ATG13 en un estado fosforilado, lo que disminuye la afinidad de ATG13 por ATG1 inhibiendo de esta forma la actividad de ATG1. La inactivación de TORC1 por rapamicina o por limitación de nutrientes causa una rápida defosforilación de ATG13 que incrementa su afinidad por ATG1 estimulando la actividad quinasa de ésta, que en última instancia inicia el proceso de formación de los autofagosomas.

La inactivación de TOR también produce una inducción de la autofagia a nivel transcripcional. El tratamiento con rapamicina o la depleción de nitrógeno en el medio produce la translocación de GLN3 al núcleo donde induce la transcripción de genes regulados por nitrógeno, algunos de los cuales son componentes de la maquinaria autofágica, como por ejemplo *ATG14* y *ATG8* (Kirisako et al., 1999; Chan et al., 2001). La realización de microarrays en células tratadas con rapamicina ha revelado que estos y otros genes como *ATG1*, *ATG3*, *ATG4*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG12* y *ATG13* son regulados transcripcionalmente por TOR (Cardenas et al., 1999; Natarajan et al., 2001).

TOR actúa como un regulador de la autofagia también en organismos fotosintéticos. El alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* es sensible a rapamicina y el tratamiento con este inhibidor produce una vacuolización característica de las células cuando se induce el proceso de autofagia (Pérez-Pérez et al., 2010a; Pérez-Pérez y Crespo, 2010b).

En *A. thaliana* se ha identificado un homólogo de TOR (Menand et al., 2002), pero el estudio de la funcionalidad e implicación de esta proteína en autofagia no ha sido posible por dos razones: la primera es que la disrupción del gen *AtTOR* es letal, lo que dificulta el estudio de sus funciones post-embrionarias; la segunda razón es que la proteína TOR de *Arabidopsis* es insensible al inhibidor rapamicina, por lo que no puede ser empleado para el estudio de la ruta de señalización por TOR en esta especie (Mahfouz et al., 2006). Para producir el efecto inhibidor, la rapamicina debe primero unirse y formar un complejo con la inmunofilina FKBP12, y es el complejo FKBP12-rapamicina el que inhibe la actividad de TOR. La proteína FKBP12 de plantas es incapaz de unirse a la rapamicina y por tanto de inhibir a TOR. Para superar estas limitaciones se han desarrollado varias estrategias. Se han generado líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan la proteína FKBP12 funcional de levaduras que reconoce e interacciona con la rapamicina. La modificación de los niveles de expresión de *AtTOR* mediante la generación de plantas sobre-expresoras y plantas silenciadas por RNAi ha sido otra de las aproximaciones experimentales llevadas a cabo (Deprost et al., 2007; Sormani et al., 2007). A través del estudio de plantas de *A. thaliana* que expresan el *RNAi-AtTOR* se ha demostrado que TOR interviene como un regulador negativo de la autofagia también en plantas superiores. Sin embargo, se desconocen las señales que controlan a TOR aguas arriba y los componentes regulados por TOR aguas abajo (Liu y Bassham, 2010).

Existen, además, otras proteínas quinasas aparte de TOR que han sido identificadas como reguladores del proceso autofágico en levaduras y animales. La proteína quinasa dependiente de AMPc (AMPK) presente en mamíferos y su homólogo en levaduras SNF1 regulan la inducción de la autofagia. En plantas, han sido identificados homólogos de SNF1/AMPK. En concreto, en *Arabidopsis*, AKIN10, induce varios genes implicados en autofagia (Harding et al., 1995), lo que sugiere que las proteínas AMPK poseen una función reguladora de la autofagia conservada en plantas, aunque es necesario un estudio más detallado para confirmar esta hipótesis.

3.2.2. Regulación redox

Una consecuencia inevitable del metabolismo aerobio es la producción de ROS. Estas especies reactivas incluyen radicales libres tales como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), así como especies sin carga como el H_2O_2 . En los organismos fotosintéticos, el cloroplasto es el principal productor de ROS aunque la mitocondria, los peroxisomas y la enzima NADPH oxidasa de la membrana plasmática (NOX) son también una fuente de estas especies altamente reactivas. De entre los diferentes tipos de ROS generados en la célula, el

H₂O₂ es la molécula más estable capaz además de difundir a través de las membranas, a diferencia del anión superóxido (O₂⁻) y el radical hidroxilo (OH[•]), que no pueden abandonar el cloroplasto y son rápidamente transformados en otras ROS.

La producción celular de ROS tiene lugar durante determinadas etapas del desarrollo actuando como mensajero en la señalización de diferentes procesos celulares (Foyer y Noctor, 2009). Sin embargo, bajo ciertas condiciones de estrés ambiental, la producción de ROS excede a los sistemas antioxidantes de la célula, lo que lleva a una acumulación de estas especies y a la generación de un estrés oxidativo (Han et al., 2011).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto el papel de las ROS en la activación de la autofagia no sólo en levaduras y mamíferos, sino también en algas y en plantas (Kiššová et al., 2006; Scherz-Shouval et al., 2007a; Xiong et al., 2007a; Liu et al., 2009; Pérez-Pérez et al., 2010a; Pérez-Pérez et al., 2012a). En levaduras, la activación de la autofagia por rapamicina va acompañada de la producción de ROS y de la oxidación de los lípidos presentes en la mitocondria (Kiššová et al., 2006). En mamíferos, la carencia de aminoácidos estimula la producción de ROS, especialmente de H₂O₂ en la mitocondria, con la consiguiente activación del proceso autofágico (Scherz-Shouval et al., 2007a) y la privación de glucosa media la activación de la autofagia a través de la señalización por O₂⁻ (Chen et al., 2009). Investigaciones realizadas en *C. reinhardtii* han puesto de manifiesto la implicación de las ROS en la activación del proceso autofágico en respuesta a diferentes condiciones de estrés. La inhibición de la biosíntesis de carotenoides, el estrés producido en el retículo endoplasmático por la acumulación de proteínas mal plegadas, el tratamiento con agentes oxidantes como el H₂O₂ o la exposición a metales son condiciones que activan la autofagia de forma dependiente de ROS en *C. reinhardtii* (Pérez-Pérez et al., 2010a; Pérez-Pérez et al., 2012a; Pérez-Pérez et al., 2012b; Pérez-Martín et al., 2014; Pérez-Martín et al., 2015). En plantas, la autofagia se induce también por la presencia incontrolada de ROS ya que una de las finalidades de este proceso es la degradación de componentes celulares dañados por estas especies altamente reactivas. En *Arabidopsis*, la aplicación exógena de H₂O₂ o el tratamiento con el inductor de la producción de ROS, metilviológeno (MV), causan una inducción de la autofagia. El silenciamiento del gen *ATG18a* en plantas RNAi-AtATG18a produce una mayor sensibilidad al estrés oxidativo y una mayor acumulación de proteínas oxidadas en comparación con plantas silvestres (Xiong et al., 2007a; Xiong et al., 2007b). Plantas mutantes para los genes *ATG2* y *ATG5* acumulan grandes cantidades de H₂O₂ (Yoshimoto et al., 2009). Otro trabajo ha demostrado que la inducción de la autofagia provocada por salinidad o por carencia de nitrógeno en *Arabidopsis* es dependiente de la producción de ROS mediada por la NADPH oxidasa, mientras que la activación del proceso autofágico por estrés osmótico es independiente de ROS (Liu et al., 2009). El mecanismo por el que se produce la inducción de la autofagia por ROS podría ser consecuencia de la modificación redox de una o varias proteínas implicadas en este proceso.

Se ha demostrado que la proteína ATG4 es diana de esta regulación redox, siendo hasta la fecha la única proteína ATG a la que se le ha descrito este tipo de regulación (Scherz-Shouval et al., 2007a; Pérez-Pérez et al., 2014; Woo et al., 2014). ATG4 es una cisteína proteasa muy importante en el proceso de autofagia, ya que tiene un papel dual en la formación del autofagosoma. Por un lado, ATG4 procesa a la proteína ATG8 por su extremo carboxilo antes de ser conjugada con el lípido PE, evento fundamental en la formación del autofagosoma; y, por otro lado, ATG4 es responsable también de la delipidación de ATG8 con la consiguiente separación de esta proteína de la membrana del autofagosoma (Kirisako et al., 2000). Debido a la dualidad e importancia de la función de ATG4, su actividad debe estar muy regulada. Se desconoce si ambas actividades de ATG4 se regulan de forma diferente o simplemente están separadas en el tiempo y el espacio, ya que el procesamiento de ATG8 tiene lugar sobre la proteína recién sintetizada y es necesaria para la formación del autofagosoma mientras que la delipidación debe producirse cuando la autofagia ya no es necesaria y ATG8 debe ser reciclado.

En mamíferos, la limitación de nutrientes produce un incremento en la acumulación de H_2O_2 cerca de la mitocondria, lo que provoca la oxidación e inactivación de la actividad delipidante de ATG4, promoviendo con ello la progresión de la autofagia. Se ha identificado un residuo de cisteína, Cys⁸¹, localizado muy cerca del residuo de cisteína catalítico (Cys⁷⁷) como la diana de esta regulación redox y cuya mutación impide la acumulación de ATG8-PE y con ello, la formación de los autofagosomas (Scherz-Shouval et al., 2007a).

Por otra parte, se ha demostrado que la proteína Atg4 de levaduras se regula mediante la oxido-reducción de un puente disulfuro específico, establecido entre los residuos de cisteína, Cys³³⁸ y Cys³⁹⁴ que se encuentran conservados en hongos, plantas y algas. La oxidoreductasa tiorredoxina es responsable de la reducción de este puente disulfuro de forma muy eficiente y con ello de la activación de ATG4 (Pérez-Pérez et al., 2014).

De forma análoga a lo que ha sido descrito en humanos y levaduras, las dos isoformas de ATG4 presentes en *Arabidopsis* son inhibidas bajo condiciones oxidantes y su actividad es restaurada en presencia de DTT, lo que pone de manifiesto la reversibilidad de esta regulación (Woo et al., 2014).

3.2.3. Regulación por modificaciones post-traduccionales

Las modificaciones post-traduccionales (MPTs) implican la modificación química de una proteína después de ser traducida, resultando en la inhibición o la potenciación de su actividad. Las MPTs juegan un papel fundamental en casi todos los aspectos funcionales y estructurales de la célula. Los principales tipos de MPTs incluyen la fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, metilación, acetilación y lipidación. A continuación se presentan varios tipos de MPTs que tienen lugar sobre proteínas ATG y que influyen por tanto en el proceso autofágico.

La fosforilación es la MPT más estudiada en la regulación de la autofagia en levaduras y mamíferos. La iniciación del proceso autofágico depende del estado de fosforilación del complejo ATG1 que repercute tanto en el ensamblaje del complejo como en la activación del mismo. Como se describe anteriormente, la fosforilación-defosforilación de las proteínas ATG13 y ATG1 por parte de TOR es fundamental para la inducción de la autofagia (Codogno, 2004). La autofosforilación de ATG1 es importante también para mantener su actividad quinasa durante la inducción de la autofagia (Yeh et al., 2010). La regulación de la autofagia por parte de PKA también se basa en los eventos de fosforilación y defosforilación. La inactivación de la vía de señalización por PKA es suficiente para inducir la autofagia en levaduras mediante la defosforilación de ATG13 y ATG1 lo que a su vez influye en la localización de estas proteínas en el PAS (Stephan et al., 2009). La localización de la proteína transmembrana ATG9 en el PAS también depende de su fosforilación por parte de ATG1 (Reggiori et al., 2004).

La actividad del complejo VPS34/ATG6/VPS15 es controlada, positiva o negativamente, mediante la fosforilación de sus componentes. VPS15 fosforila a VPS34 y esta MPT es necesaria para la formación del complejo (Stack et al., 1993).

Se ha demostrado que una de las isoformas de ATG9 presente en humanos posee cuatro posibles sitios de N-glicosilación, aunque solo se ha identificado dicha modificación en uno de ellos. La implicación de ATG9 en la coordinación del transporte de membrana entre zonas donadoras hasta el PAS se debe en parte a la glicosilación (Young et al., 2006; Ohashi y Munro, 2010).

Además de los dos sistemas análogos a los de ubiquitinación descritos anteriormente, las proteínas ULK1 y BECN1, los ortólogos humanos de ATG1 y ATG6 de levaduras, respectivamente, son modificadas mediante ubiquitinación y esto regula la respuesta autofágica (Shi y Kehrl, 2010; Nazio et al., 2013).

En levaduras, la acetilación de ATG3 por la acetiltransferasa Esa1 potencia la autofagia, mientras que su deacetilación por parte de Rpd3 ejerce el efecto contrario (Yi et al., 2012). En mamíferos, son varias las proteínas ATG que sufren este tipo de MPT. Así, la acetilación de ATG5, ATG7, ATG8 y ATG12 por EP300 producen una disminución de los niveles de autofagia, mientras que la deacetilación de esas proteínas mediada por SIRT1, produce una regulación positiva de dicho proceso (Lee et al., 2008; Lee y Finkel, 2009).

Otro tipo de MPT con una gran relevancia en la progresión del proceso autofágico es la lipidación de la proteína ATG8. La unión covalente entre ATG8 y el lípido PE es crucial para la formación de los autofagosomas así como para el estudio y seguimiento de este proceso en muchos organismos, como se ha detallado anteriormente (Kirisako et al., 2000).

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado otro tipo de MPT que podría tener una importante repercusión en la regulación de la autofagia. La S-sulfhidratación de residuos de cisteína ha sido propuesto como un nuevo tipo de MPT análogo a la S-nitrosilación en diferentes organismos

(Mustafa et al., 2009; Aroca et al., 2015). Proponemos que la S-sulfhidratación de la proteína ATG4 de *A. thaliana* puede modular su actividad regulando de esta forma la autofagia.

3.3. Funciones fisiológicas de la autofagia en plantas

A pesar de que el proceso de autofagia ha sido más estudiado bajo condiciones de estrés, en las plantas existe un nivel basal de autofagia en condiciones óptimas de crecimiento (Figura 14). Esta autofagia basal participa en la eliminación de proteínas y orgánulos dañados producidos continuamente bajo condiciones normales de crecimiento y participa también en la biogénesis de la vacuola, y en general en el mantenimiento de la homeostasis celular (Bassham et al., 2006; Yano et al., 2007).

La mayoría de las plantas mutantes de autofagia (*atg*) cultivadas en condiciones óptimas de crecimiento son capaces de completar sus ciclos de vida, presentando un fenotipo similar al de plantas silvestres en lo que se refiere a desarrollo embrionario, germinación, formación de los diferentes tejidos, floración y producción de semillas. Sin embargo, ante condiciones de limitación nutricional (nitrógeno o carbono) exhiben una acelerada clorosis, una inducción de la senescencia y una disminución en el desarrollo de las raíces. Esto significa que ante situaciones de escasez, la autofagia es necesaria para una correcta movilización y distribución de los nutrientes en las células (Hanaoka et al., 2002; Thompson et al., 2005b). De hecho, la inducción de la autofagia por limitación nutricional es una de las condiciones más estudiadas (Figura 14).

Este papel en el reciclaje de nutrientes hace de la autofagia un proceso importante durante la senescencia y la germinación de las semillas, las dos grandes etapas de movilización de nutrientes a lo largo del ciclo de vida de la planta. Alrededor del 80% del nitrógeno total de las hojas se encuentra en los cloroplastos y durante la senescencia las plantas reciclan los nutrientes presentes en los cloroplastos para proveer a los nuevos órganos en desarrollo, como las semillas (Guiboileau et al., 2010). En este contexto, se sabe que la autofagia participa en la degradación de los RCBs ("RuBisCO containing bodies"), unas pequeñas vesículas que transportan componentes estromáticos procedentes de los cloroplastos (Ishida et al., 2008).

Como se ha descrito anteriormente, la presencia excesiva de ROS o estrés oxidativo es otra condición que induce la autofagia en diferentes organismos, incluidas las plantas (Figura 14). La capacidad de la autofagia de eliminar proteínas oxidadas y de regular los niveles de ROS hace que sea un proceso importante ante situaciones que generan estrés oxidativo como la sequía, la salinidad, la carencia nutricional y la infección por patógenos, entre otras (Xiong et al., 2007a; Hayward et al., 2009; Liu et al., 2009; Yoshimoto et al., 2009).

La forma en la que la autofagia contribuye a la respuesta inmune en plantas es muy diversa y su efecto puede suponer la supervivencia o la muerte celular, dependiendo del tipo de patógeno, del tipo de receptor inmune involucrado o de la edad de la planta (Figura 14).

En *Arabidopsis*, la infección por el hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* induce la autofagia tanto en las células infectadas como en células sanas adyacentes. Las plantas mutantes *atg* son más sensibles a la infección por el hongo en comparación con las plantas silvestres y presentan una mayor propagación de la necrosis y una aceleración en la degradación de ciertas proteínas. El factor de transcripción WRKY33, implicado en la resistencia de la planta a patógenos necrótrofos, interacciona con la proteína autofágica ATG18a en el núcleo (Lai et al., 2011). Por tanto, durante la infección por patógenos necrótrofos la autofagia actúa promoviendo la supervivencia de la planta. La susceptibilidad de los mutantes *atg* a patógenos necrótrofos podría explicarse por la supresión de la vía de señalización por ácido jasmónico, la cual es necesaria para la resistencia frente a este tipo de patógenos, debido a una excesiva señalización o acumulación de SA (Koornneef et al., 2008; Lenz et al., 2011).

En cambio, el papel de la autofagia durante la infección por patógenos biótrosos es más complejo. Las plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) silenciadas en el gen *ATG6* e infectadas con el virus del mosaico del tabaco exhiben una propagación del virus a otras zonas de la planta. Estos resultados indican que ATG6 o procesos regulados por ATG6 limitan la muerte celular asociada a la respuesta hipersensible (HR) a la zona de infección (Liu et al., 2005). Se han obtenido resultados similares en plantas de *Arabidopsis* silenciadas también en el gen *ATG6* y en mutantes *atg5*, donde tras la infección con la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 *avrRpm1*, la HR se propaga al tejido sano adyacente (Patel y Dinesh-Kumar, 2008; Yoshimoto et al., 2009). Estos resultados sugieren que la autofagia actúa restringiendo la HR, posiblemente a través de la degradación de señales celulares que promueven la muerte celular (Lenz et al., 2011). Sin embargo, otros estudios llevados a cabo con mutantes *atg7* y *atg9* de *Arabidopsis* han descrito una reducción de la muerte celular y un incremento de la resistencia frente a la cepa avirulenta de la bacteria *Pst* DC3000 *avrRps4* (Hofius et al., 2009). Esto sugiere, por el contrario, que la autofagia funciona potenciando la muerte celular durante la HR. Estos resultados contradictorios observados durante la infección por patógenos biótrosos pueden deberse a las diferencias de edad de las plantas utilizadas en los experimentos, lo que a su vez está relacionado con los niveles endógenos de SA o al tipo de receptor involucrado en el reconocimiento del efector.

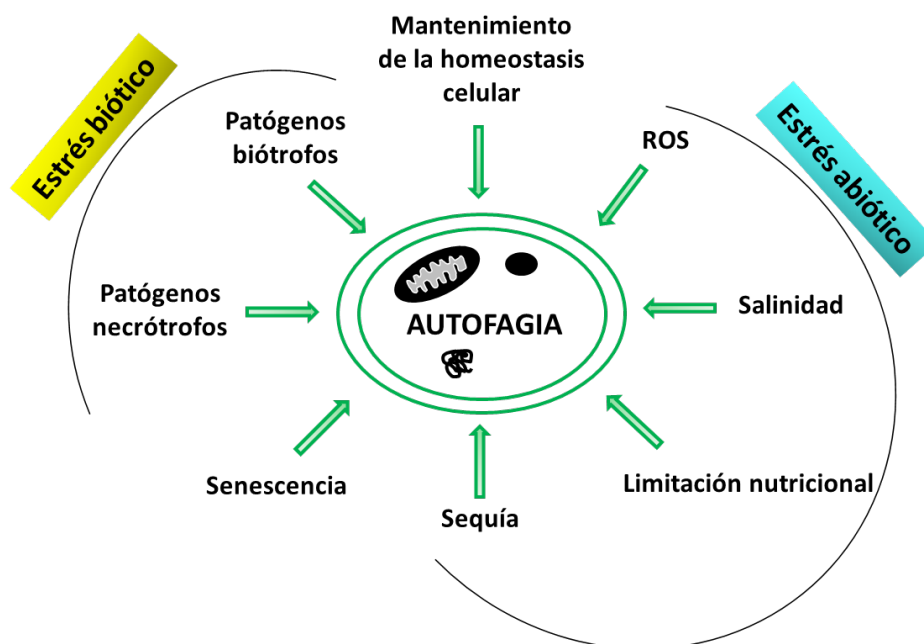


Figura 14: Condiciones fisiológicas y ambientales en las que participa la autofagia en *Arabidopsis*.

3.4. Estudio de la autofagia en plantas

Debido al gran número de procesos que regula en la planta, la autofagia ha despertado un gran interés entre la comunidad científica. Esto ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas de estudio y la mejora de las ya existentes. A continuación se detallan las técnicas de detección de la autofagia que han sido utilizadas en esta Tesis Doctoral.

3.4.1. Detección de GFP-ATG8 por microscopía

ATG8 es un componente central de la maquinaria de la autofagia y además es la única proteína que permanece unida al autofagosoma a lo largo de todo el proceso autofágico, como se ha descrito previamente. Su unión covalente al lípido PE produce una asociación estable con la membrana. Así, ATG8 está presente en el fagóforo y se localiza tanto en la membrana interna como en la externa del autofagosoma en formación. Una vez fusionado con el tonoplasto, el cuerpo autofágico localizado en el interior de la vacuola también contiene ATG8 en su membrana. Estas características hacen de ATG8 un marcador ideal del proceso de autofagia desde etapas tempranas hasta etapas más tardías.

El marcaje de la proteína ATG8 se realiza mediante la fusión N-terminal con la proteína fluorescente verde (GFP) u otras variantes de diferente color. La expresión de esta proteína recombinante puede realizarse de forma transitoria (Contento et al., 2005) o de forma estable en plantas transgénicas de *Arabidopsis* para ser monitorizadas posteriormente mediante microscopía confocal (Thompson et al., 2005b; Xiong et al., 2007a).

En ausencia de estrés, la proteína recombinante GFP-ATG8 se localiza en el citoplasma como fluorescencia difusa y a veces puede apreciarse formando parte de estructuras punteadas. Estos puntos corresponden a los autofagosomas formados en respuesta a la autofagia basal presente en las células. Una vez expuesta la planta a una determinada condición de estrés, el número de puntos o estructuras puntiformes aumenta rápidamente, a menudo de forma proporcional a la severidad del estrés. Sin embargo, la acumulación de cuerpos autofágicos dentro de la vacuola y por tanto la visualización de los mismos es más fácil en células que carecen de actividad hidrolasa dentro de este compartimento. Para ello, es común el uso de inhibidores de la H^+ -ATPasa vacuolar como la concanamicina A (ConA). El pretratamiento de las células con este compuesto produce un aumento del pH del lumen de la vacuola lo que inhibe la actividad de las hidrolasas y produce la acumulación de los cuerpos autofágicos dentro de la vacuola. La cuantificación de la autofagia puede realizarse contabilizando el número de estructuras marcadas con GFP-ATG8 por célula o midiendo la intensidad de fluorescencia por área, utilizando para ello un software adecuado.

Aunque no han sido empleadas en este trabajo de Tesis, existen otras proteínas ATG marcadas, además de ATG8, que han demostrado co-localizar con los autofagosomas y con estructuras relacionadas y que han sido utilizadas en varios estudios. Las fusiones fluorescentes de ATG1, ATG13 y ATG11 coinciden con estructuras puntiformes en el citoplasma en situaciones que inducen la autofagia, además son liberadas a la vacuola y se acumulan en presencia de ConA (Suttangkakul et al., 2011; Li et al., 2014). GFP-ATG6 es otra de las proteínas marcadoras que co-localiza con ATG8 durante el proceso de autofagia (Fujiki et al., 2007), sin embargo, esta construcción ha de usarse con precaución ya que ATG6 interviene en otras rutas de transporte no relacionadas con la autofagia (Harrison-Lowe y Olsen, 2008).

Por su parte, GFP-ATG5 ha sido empleada en el marcaje de estructuras presentes en etapas tempranas del proceso de formación del autofagosoma ya que una vez completado éste, GFP-ATG5 se disocia de dicha estructura (Le Bars et al., 2014).

3.4.2. Métodos bioquímicos

La aproximación bioquímica más utilizada es el análisis de perfiles proteicos obtenidos mediante análisis de western, de gran utilidad a la hora de analizar y cuantificar el proceso de autofagia, y que puede utilizarse como una alternativa a la microscopía o incluso en combinación con ésta. Sin embargo, se ha demostrado que los ensayos de western son más difíciles de aplicar y de interpretar en células vegetales en comparación con las animales.

Algunos ensayos pueden ser fiables si se compara el proceso de autofagia entre mutantes y plantas silvestres, pero determinar el grado de activación del proceso autofágico en diferentes condiciones sigue siendo complicado.

La unión covalente de ATG8 al lípido PE constituye un paso clave en la formación de los autofagosomas y además supone un marcaje de las vesículas formadas durante el proceso de autofagia con la proteína ATG8. Esta característica ha sido utilizada para determinar la actividad autofágica en células animales mediante la comparación de la cantidad de proteína ATG8 lipídada (ATG8-PE) con la de su forma libre (ATG8) (Kabeya et al., 2000).

La existencia de 9 isoformas distintas ATG8 en el genoma de *Arabidopsis* complica mucho el estudio de la autofagia cuando se utilizan anticuerpos comerciales. La gran homología de secuencia entre las distintas isoformas se traduce en un reconocimiento poco específico de los anticuerpos comerciales generados por ejemplo frente a la isoforma ATG8a. Este anticuerpo reconoce a la mayoría de las isoformas así como a los productos de degradación de las mismas. Una aproximación que ha resultado exitosa en el reconocimiento de las proteínas ATG8 de *Arabidopsis* ha sido la utilización de los anticuerpos policlonales obtenidos frente a la única proteína ATG8 de *C. reinhardtii* (Álvarez et al., 2012b). Estos anticuerpos no solo reconocen con bastante especificidad a las proteínas de *Arabidopsis*, sino que además se han mostrado más eficientes que los anti-ATG8a comerciales. Una desventaja del anticuerpo anti-ATG8a es que también reconoce a proteínas inespecíficas que migran en un gel cuando se someten a electroforesis, de forma muy parecida a como lo hace la forma lipídada de la proteína, lo que complica aún más el análisis en *Arabidopsis*. Para solventar estos problemas es útil el empleo de mutantes afectados en el proceso de lipidación como es el caso del mutante *atg7* o del doble mutante *atg4a4b*. La comparación del perfil proteico obtenido mediante análisis de western de estos mutantes con el de la planta silvestre permite determinar qué bandas se corresponden con la forma lipídada de ATG8 (Yoshimoto et al., 2004; Thompson et al., 2005b; Phillips et al., 2008). Otro método para confirmar la identidad de las especies lipidadas de forma inequívoca es el tratamiento con la enzima fosfolipasa D. La incubación con esta enzima elimina la porción lipídica de ATG8, lo que se traduce en un cambio de movilidad de dicha proteína. La técnica de fraccionamiento subcelular es también muy empleada para la correcta identificación de las bandas proteicas en *Arabidopsis*. Con esta técnica se produce una acumulación (enriquecimiento) de las especies lipidadas de ATG8 en la fracción de membrana mientras que las formas no lipidadas de ATG8, junto con los productos de degradación de las mismas, se localizan preferentemente en la fracción soluble (Yoshimoto et al., 2004; Chung et al., 2009).

La detección de la proteína de fusión GFP-ATG8 en las plantas transgénicas también puede realizarse empleando anticuerpos frente a GFP en lugar de frente a ATG8. La lipidación de la proteína recombinante ocurre de igual forma que la lipidación de la proteína ATG8 endógena. La detección de GFP-ATG8 lipídada con los anticuerpos frente a GFP (o frente a ATG8) reviste una mayor complicación debido al gran tamaño de la proteína de fusión y a la pequeña diferencia de peso que existe entre ésta y su forma lipídada. Una aproximación más útil es la detección de la proteína GFP libre producida en la vacuola tras la liberación a su interior de los

Introducción

autofagosomas marcados (Shin et al., 2014). El procesamiento de la proteína de fusión solo ocurre dentro de la vacuola y no se produce en mutantes *atg* (Chung et al., 2010; Shin et al., 2014). Por tanto, la cuantificación de la proteína GFP libre muestra el flujo a través de la vía autofágica.

Objetivos

Objetivos

El objetivo fundamental de este proyecto de Tesis Doctoral es descifrar el papel del sulfuro generado a partir de cisteína en la regulación de procesos esenciales de la planta. Para ello, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis de la regulación transcripcional de la proteína DES1, responsable de la generación de sulfuro en el citosol.
2. Implicación del sulfuro en la regulación de la autofagia inducida por limitación de nitrógeno.
3. Estudio del mecanismo de acción del sulfuro y sus dianas moleculares en la regulación de la autofagia.

Capítulo I

Análisis de la regulación transcripcional de la proteína DES1, responsable de la generación de sulfuro en el citosol



Assessing the transcriptional regulation of L-cysteine desulfhydrase 1 in *Arabidopsis thaliana*

Ana M. Laureano-Marín, Irene García, Luis C. Romero and Cecilia Gotor*

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

Edited by:

Stanislav Kopriva, University of Cologne, Germany

Reviewed by:

Anna Wawrzynska, Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences, Poland
Min-jie Cao, Chinese Academy of Sciences, China

*Correspondence:

Cecilia Gotor, Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Avenida Américo Vespucio, 49, 41092 Sevilla, Spain
e-mail: gotor@ibvf.csic.es

Hydrogen sulfide is an important signaling molecule that functions as a physiological gasotransmitter of comparable importance to NO and CO in mammalian systems. In plants, numerous studies have shown that sulfide increases tolerance/resistance to stress conditions and regulates essential processes. The endogenous production of hydrogen sulfide in the cytosol of *Arabidopsis thaliana* occurs by the enzymatic desulfuration of L-cysteine, which is catalyzed by the L-cysteine desulfhydrase enzyme DES1. To define the functional role of DES1 and the role that the sulfide molecule may play in the regulation of physiological processes in plants, we studied the localization of the expression of this gene at the tissue level. Transcriptional data reveal that *DES1* is expressed at all developmental stages and is more abundant at the seedling stage and in mature plants. At the tissue level, we analyzed the expression of a GFP reporter gene fused to promoter of *DES1*. The GFP fluorescent signal was detected in the cytosol of both epidermal and mesophyll cells, including the guard cells. GFP fluorescence was highly abundant around the hydathode pores and inside the trichomes. In mature plants, fluorescence was detected in floral tissues; a strong GFP signal was detected in sepals, petals, and pistils. When siliques were examined, the highest GFP fluorescence was observed at the bases of the siliques and the seeds. The location of GFP expression, together with the identification of regulatory elements within the *DES1* promoter, suggests that DES1 is hormonally regulated. An increase in *DES1* expression in response to ABA was recently demonstrated; in the present work, we observe that *in vitro* auxin treatment significantly repressed the expression of DES1.

Keywords: abscission zone, auxin, DES1 promoter, hydathode, floral tissues, promoter-GFP construct

INTRODUCTION

Hydrogen sulfide, a known toxic molecule, is considered to be an important signaling molecule. In animal systems, hydrogen sulfide functions as physiological gasotransmitter; this molecule is recognized to be of equal importance to NO and CO and has been the subject of many reviews (Gadalla and Snyder, 2010; Kimura, 2011; Wang, 2012). H₂S is mostly catalyzed via the enzymatic reactions of cystathionine β-synthase (CBS) and cystathionine γ-lyase (CSE) (Wang, 2012) in mammals. Both enzymes are known for their participation in the transsulfuration pathway, which is critical for the synthesis of cysteine from methionine. Both CBS and CSE use pyridoxal 5'-phosphate as a cofactor and are exclusively located in the cytosol (Gadalla and Snyder, 2010; Wang, 2012).

In recent years, hydrogen sulfide has been also shown to be a signaling molecule in plants similar to NO and H₂O₂. Numerous studies have demonstrated the role of sulfide in protection against numerous stress conditions. Additional studies have demonstrated that this molecule is involved in regulating essential processes such as photosynthesis, stomatal movement, senescence, and autophagy. Consequently, several reviews in plant systems have been recently released (Garcia-Mata and Lamattina,

2013; Lisjak et al., 2013; Calderwood and Kopriva, 2014; Gotor et al., 2014; Hancock and Whiteman, 2014).

Hydrogen sulfide is biosynthesized in plant chloroplasts during the photosynthetic sulfate assimilatory process by the sulfite reductase that reduces sulfite to sulfide. Due to the high toxicity of hydrogen sulfide, it is rapidly incorporated into carbon skeletons to form cysteine by the O-acetylserine(thiol)lyase (OASTL) enzymes. OASTL enzymes are found in the cytosol, plastids and mitochondria and are encoded in *Arabidopsis thaliana* by the *OAS-A1*, *OAS-B*, and *OAS-C* genes, respectively (Takahashi et al., 2011; Romero et al., 2014). In mitochondria, H₂S is also produced during the detoxification of cyanide by β-cyanoalanine synthase; this enzyme catalyzes the conversion of cysteine and cyanide to hydrogen sulfide and β-cyanoalanine. Like cyanide, sulfide is a potent inhibitor of mitochondrial cytochrome c oxidase. Sulfide in the mitochondria must be detoxified by OAS-C to produce cysteine, thus generating a cyclic pathway for cyanide/sulfide detoxification (Garcia et al., 2010; Alvarez et al., 2012b).

H₂S is also produced in plants by cysteine-degrading enzymes, such as D- and L-cysteine desulfhydrases; these enzymes also produce pyruvate and ammonium (Riemenschneider et al., 2005; Alvarez et al., 2010). We have recently shown that the

protein DES1 is a pyridoxal-5'-phosphate-dependent L-cysteine desulfhydrase located in the cytosol of *Arabidopsis* (Alvarez et al., 2010). Therefore, the H₂S levels in the cytosol are determined via the coordinated enzymatic activities of OAS-A1 and DES1 (Gotor et al., 2014; Romero et al., 2014).

Hydrogen sulfide is weakly acidic and dissociates in aqueous solutions into H⁺ and HS⁻. In this ionized form, hydrogen sulfide cannot permeate membranes (Kabil and Banerjee, 2010). In the basic pH of the chloroplast stroma under illumination, and in the mitochondrial stroma in metabolically active cells, sulfide is predominantly found in the charged HS⁻ form. Therefore, hydrogen sulfide is unable to cross out the chloroplast and mitochondrial membranes. Accordingly, DES1 is the responsible for the production of sulfide in the plant cytosol (Romero et al., 2013), with an estimated steady-state concentration of 50 μM (Krueger et al., 2009).

Recent studies have concluded that DES1 modulates the generation of sulfide for signaling in important plant processes, such as the progression of autophagy and the stomatal movement. Irrespective of nutrient conditions, it was demonstrated that sulfide exerts a general effect on autophagy in plants through negative regulation of this process (Alvarez et al., 2012a; Gotor et al., 2013). It has been recently demonstrated that sulfide generated by DES1 acts upstream of nitric oxide in the ABA signaling network in stomatal guard cells (Scuffi et al., 2014).

To gain insight into the regulation of DES1, we analyzed the tissue and cellular localization of DES1 using a *DES1* promoter-GFP construct. We found maximum levels of gene expression in the seedling and mature stages of plant development. We were able to further localize the GFP signal to vegetative and reproductive tissues in correlation with the hormonal regulation of DES1.

MATERIALS AND METHODS

PLANT MATERIAL, GROWTH CONDITIONS AND TREATMENTS

Arabidopsis thaliana wild type ecotype Col-0 and the transgenic *PromDES1-GFP* line were used in this work. Plants were grown in soil for 6 weeks with a photoperiod of 16 h of white light (120 μE m⁻² s⁻¹) at 20°C and 8 h of dark at 18°C. Alternatively, surface sterilized seeds were germinated and grown in agar-supplemented Murashige and Skoog (MS) medium for 1–2 weeks. For the auxin treatments, wild type Col-0 seeds were germinated and grown for 7 days on MS plates in the presence of 0.1 or 1 μM of indoleacetic acid (IAA).

DNA CLONING AND PLASMID CONSTRUCTION

To clone the *DES1* promoter, a 3 kb of the genomic sequence upstream from the *DES1* gene start codon was amplified using specific primers. Total DNA was isolated from young *Arabidopsis* leaves using the Qiagen DNeasy Plant Minikit. The 3 kb sequence containing the *DES1* promoter was amplified by PCR using the primers proDES1-F: CACCCATTTTATTTTACACCACG and proDES1-R: GTGGTTTGTCTTTGGAAACT and the Invitrogen proofreading Platinum Pfx DNA polymerase. PCR conditions were as follows: a denaturation cycle of 2 min at 94°C, followed by 35 amplification cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 1 min at 68°C. The amplified region was then ligated into

the Invitrogen pENTR/D-TOPO vector using the Invitrogen Directional TOPO Cloning Kit following the manufacturer's instructions. Positive clones were identified by PCR and chosen for plasmid DNA isolation. Using Invitrogen Gateway® technology, the *DES1* promoter was then cloned into the pMDC110 vector (Curtis and Grossniklaus, 2003), a plant expression vector for the construction of promoter-reporter GFP vectors. The final construct for used for plant transformation was identified by colony PCR and plasmid PCR. The construction was named *PromDES1-GFP*.

TRANSFORMATION OF ARABIDOPSIS

For plant transformation, the construct *PromDES1-GFP* was transformed into an *Agrobacterium tumefaciens* strain and then introduced into *A. thaliana* plants by dipping the developing floral tissues into a solution containing the *A. tumefaciens* strain, 5% sucrose, and 0.005% (v/v) of the surfactant Silwet L-77 (Clough and Bent, 1998). Transgenic plants were recovered by selecting seeds on solid MS medium containing 50 mg/l of hygromycin.

REAL-TIME RT-PCR

Quantitative real-time RT-PCR was used to analyze the expression of *DES1* and *OAS-A1* genes. Total RNA was extracted from different tissues of *Arabidopsis* plants or the aerial parts of *Arabidopsis* seedlings using the Qiagen RNeasy Plant Mini Kit. RNA was reverse transcribed using an oligo(dT) primer and the Invitrogen SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR following manufacturer's instructions. Gene-specific primers for each gene were designed using the Invitrogen Vector NTI Advance 10 software. Primer sequences were as follows: qDES1-F, 5'-TCGAGTCAGTCAGATATGAAGCT-3' and qDES1-R, 5'-TGTAACCTTGGTACCAACATCTCT-3' for the *DES1* gene; qOASA-F, 5'-CACGAGCGATTTTCTCCATT-3' and qOASA-R, 5'-CAATTCTCGAGGCCATGATT-3' for the *OAS-A1* gene; qUBQ-F, 5'-GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG-3' and qUBQ-R, 5'-AAAGAGATAACAGGAACGGAACATAGT-3' for the constitutive *UBQ10* gene. The PCR efficiency of all primer pairs was determined to be close to 100%. Real-time PCR was performed using the Bio-Rad iQ SYBR Green Supermix. Signals were detected on a Bio-Rad iCYCLER according to the manufacturer's instructions. The cycling profile consisted of 95°C for 10 min followed by 45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. A melting curve from 60°C to 90°C was run following the PCR cycling. The expression levels of the genes of interest were normalized to that of the constitutive *UBQ10* gene by subtracting the cycle threshold (CT) value of *UBQ10* from the CT value of the gene (ΔCT). The results shown are means ± SD of at least three independent RNA samples.

GFP LOCALIZATION BY CONFOCAL MICROSCOPY

Tissues from *Arabidopsis* at different developmental stages were visualized using a Leica TCS SP2 spectral confocal microscope. Samples were excited using the 488 nm line of an argon ion laser; emission was detected between 510 and 580 nm for GFP imaging (pseudocolored green) and between 620 and 680 nm for chloroplast autofluorescence (pseudocolored red). The microscopy images were processed using the Leica Confocal Software.

RESULTS

ISOLATION OF THE *DES1* PROMOTER REGION AND PRODUCTION OF PROMOTER-REPORTER TRANSGENIC PLANTS

Recent work has suggested that *DES1* modulates the generation of sulfide in the cytosol for signaling purposes (Gotor et al., 2013; Romero et al., 2013). Mutations in *DES1* result in premature leaf senescence in mature plants, which can be observed at transcriptional and cellular levels; and at the seedling stage, an increased tolerance to abiotic stress is observed (Alvarez et al., 2010, 2012a). To determine the role of *DES1* in plant growth and development, we examined the spatial and temporal regulation of *DES1* gene expression. For this purpose, promoter-GFP transgenic plants were constructed using a 3002 bp fragment isolated from the *DES1* promoter region. This fragment comprises the genomic region upstream from the *DES1* gene and its first intron. The intron was included based on a previous report demonstrating that the first intronic region of the *OAS-A1* gene, other member of the OASTL family, includes essential elements for tissue-specific expression (Gutierrez-Alcala et al., 2005). Thus, the *DES1* promoter consists of 2836 bp from the intergenic region between *DES1* (At5g28030) and the upstream gene At5g28040, 14 bp of the first exon containing the 5'-UTR region, 118 bp of the first intron and 34 bp of the second exon that contains the remainder of the 5'-UTR region, immediately upstream of the translation initiation site (Supplemental

Figure 1; www.arabidopsis.org). The promoter sequence was analyzed for cis-acting regulatory elements using available web tools (AthaMapMan; AGRIS; PLACE). Several binding site motifs were detected, including ABA- and Auxin-related elements and leaf development and senescence-regulatory elements (Table 1).

The *DES1* promoter was fused to the *GFP* gene. The plant transformation construct was named *PromDES1-GFP*. Six transgenic *A. thaliana* plants were obtained; and homozygous lines were analyzed by laser confocal microscopy for *in vivo* GFP detection. One T4 line was selected for further studies.

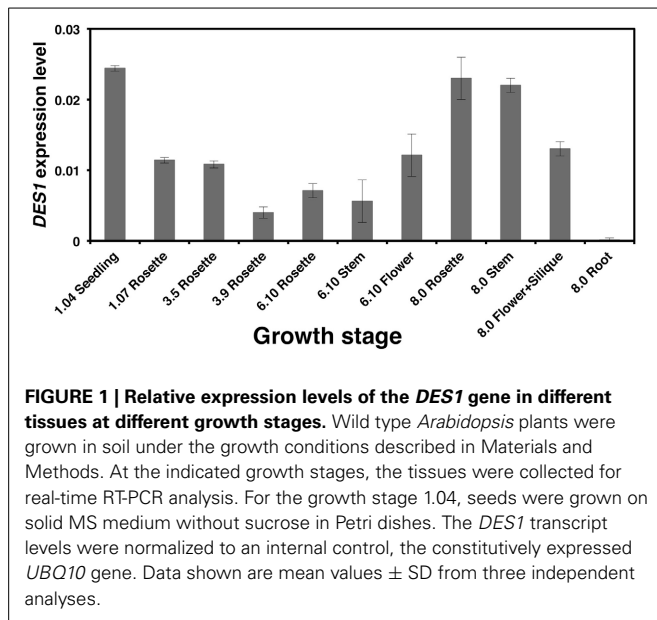
DEVELOPMENTAL *DES1* EXPRESSION PROFILES IN ARABIDOPSIS WILD TYPE PLANTS

To investigate the transcriptional regulation of the *DES1* gene, we first examined its expression profile during the development and in different tissues of wild type *Arabidopsis* plants, using real-time RT-PCR analysis. Tissues were harvested either from seedlings grown on MS plates without sucrose or from plants grown in soil at different growth stages up to maturity (Boyce et al., 2001). The highest *DES1* expression levels were detected in leaf tissues at the beginning and end of plant development; this corresponded to 14-day-old seedlings (growth stage 1.04) and to 35-day-old plants (growth stage 8.0). Flowering was completed at growth stage 8.0, at least under our experimental conditions (Figure 1). The lowest *DES1* expression level found in leaves was observed at growth

Table 1 | List of various cis-regulatory elements and their positions in the *DES1* promoter.

	Function	cis element	Sequence	Position	TF family
1	Defense against insect herbivory	AtMYC2 BS in RD22	CACATG	(1578-1583)	BHLH
2	Development	Bellringer/Replumless /Pennywise	AAATTAAA	(2593-2600)	Homeobox
3	Development	Bellringer/Replumless /Pennywise	AAATTAGT	(1368-1375)	Homeobox
4	Development	Bellringer/Replumless /Pennywise	ACTAATTT	(293-300)	Homeobox
5	Response to hiperosmolarity	ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	ACTCAT	(2537-2542)	bZIP
6	Auxins response	ARF1 binding site motif	TGTCTC	(177-182) (1820-1825)	ARF
7	ABA response	DPBF1&2 binding site motif	ACACTAG	(897-904)	bZIP
8		MYB binding site promoter	AACCAAAC	(2359-2366)	MYB
9	Defense and stress	MYB4 binding site motif	AACCAAAC	(825-831) (775-781) (2446-2452)	MYB4
10	Leaf maturation and senescence	RAVI-A binding site motif	CAACA	(1-5) (2138-2142) (1508-1512) (583-587) (360-367)	ABI3VPI
11	Development	LFY consensus binding site motif	CCAATG	(1413-1418)	LFY
12		BoxII promoter motif	GGTTAA	(2810-2815)	
13	Drought response	DRE-like promoter motif	TACCGACCA	(533-541)	
14	Light response	GATA promoter motif [LRE]	TGATAG	(2957-2962)	
15	Light response	GATA promoter motif [LRE]	AGATAA	(287-292) (96-101)	
16	Light response	GATA promoter motif [LRE]	TGATAA	(2308-2313)	
17		Hexamer promoter motif	CCGTCG	(649-654)	
18		T-box promoter motif	ACTTIG	(1529-1534)	

The immediate upstream nucleotide of the start codon is designated as position 1 as shown in the Supplemental Figure 1.



stage 3.9, which corresponded to plants where rosette growth was complete but before flower buds were visible. Curiously, the *DES1* expression levels in reproductive tissues (flowers and siliques) were significantly greater compared to rosette leaves in plants at vegetative growth stages.

GFP EXPRESSION DRIVEN BY THE *DES1* PROMOTER IN VEGETATIVE TISSUES

The tissue-specific expression of the *DES1* gene was examined further using the promoter-GFP approach. GFP was visualized in *PromDES1-GFP* plants using confocal microscopy. GFP expression largely correlated with *DES1* expression profiles in wild type plants at the whole tissue level. At the seedling stage, we detected GFP fluorescence in the whole leaf; fluorescence was observed initially at 7 days after sowing (Figure 2). A closer examination of the abaxial side of the leaf revealed some specific sites with high GFP accumulation. High expression at the very tip of the leaf would correspond with hydathode pores (Figures 2A–D). In epidermal cells, we localized the GFP signal to the thin layer of cytoplasm underneath the cell wall; this included the guard cells of the stomata (Figures 2E,F). The localization of GFP to the nucleus that we observed was likely due to the relatively small size GFP, which can translocate to the nucleus on its own through nuclear pores (Seibel et al., 2007).

GFP localization was also observed throughout the adaxial side of the leaf in 7-day-old seedlings. Obscure zones with no fluorescence corresponded to trichomes growing upwards in the vertical plane (Figures 2G,H). A strong GFP signal was observed inside the trichomes and in the trichome basement cells; GFP was localized to the cytoplasmic strands and clearly detectable (Figure 2I). GFP also appeared in the base of the petiole (Figure 2J). In root tissues, GFP was only observable in the hypocotyl-root transition zone (Figure 2K).

At the 1.04 growth stage (14-day-old seedlings), the GFP signal increased and was distributed throughout the leaf (Figure 3).

Accordingly, the maximum GFP localization was associated with the hydathode pores; the larger the leaf, the greater number of hydathodes contained (Figures 3A–C). A closer look at the mesophyll cell layer (Figures 3D,E) and leaf vascular tissues (Figure 3F) also revealed GFP expression. At this growth stage, GFP was detectable in root tissues; fluorescence was mostly observed in the meristematic zone and vascular tissues (Figures 3G–I).

GFP EXPRESSION DRIVEN BY THE *DES1* PROMOTER IN REPRODUCTIVE TISSUES

At the mature stage, the promoter-GFP approach also confirmed previous data concerning *DES1* expression at the organ level. A significant level of GFP fluorescence was observed in floral tissues (Figure 4). In open flowers, a strong GFP signal was detected in the upper pistil and at the base of the pistil; only a very weak signal was observed in the stigma. The ovules inside the pistil were clearly distinguishable as black dots against the green GFP signal; this indicated that no GFP expression occurred in these cells (Figures 4A–D). A lower level of GFP fluorescence was observed in the stamen and was detectable both in the anther and the filament (Figures 4E,F). The GFP signal in the sepals and petals of the flower was high in the vascular tissues; GFP expression appeared to be significantly greater in the sepal than in the petal (Figures 4G–L).

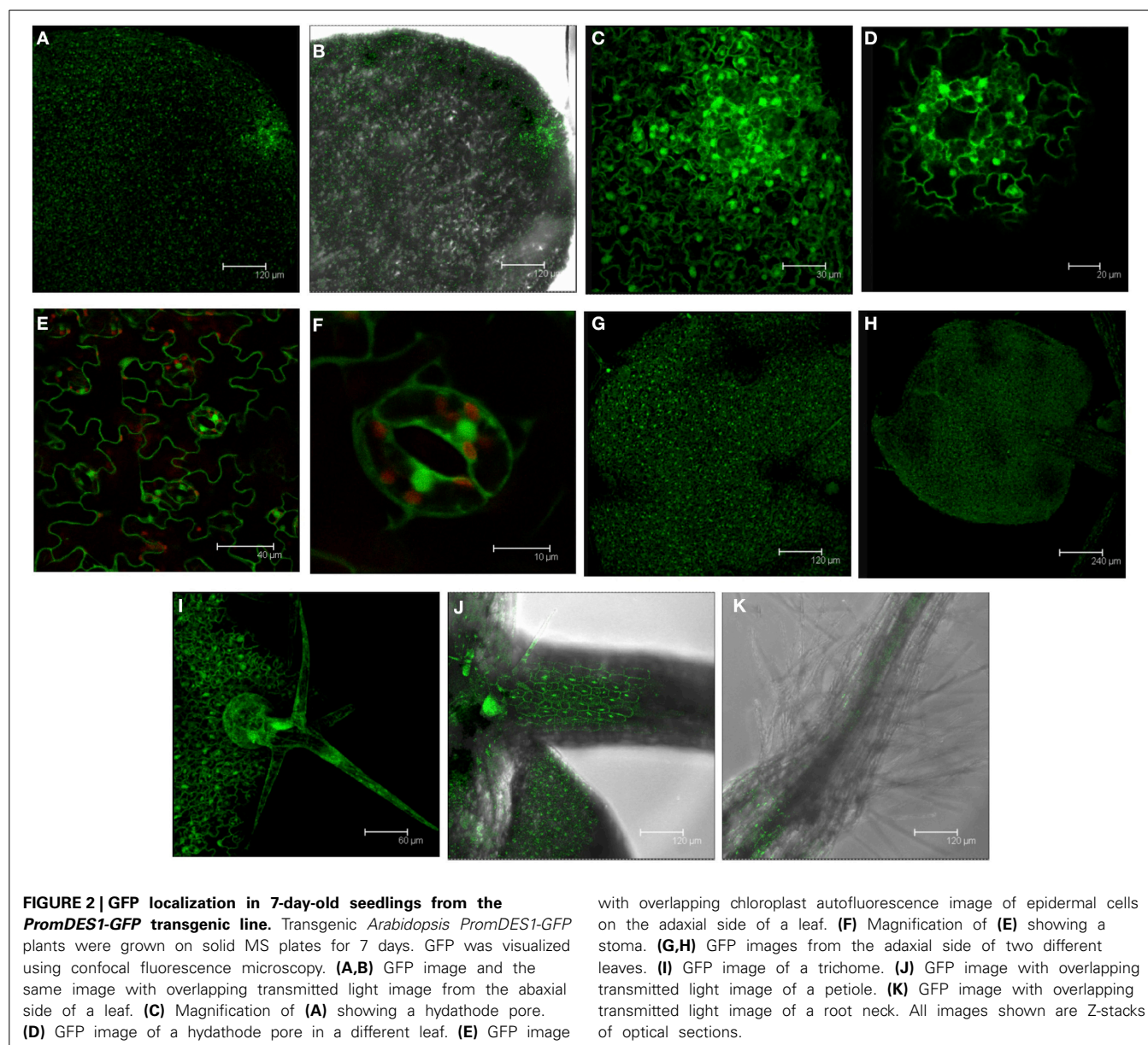
We also examined the green siliques containing developing seeds. A GFP signal was detected in the valve of the silique and the highest GFP expression was observed at the base of the seeds (Figures 5A–C). A closer look at the seed showed that the high GFP fluorescence appeared to be associated with the seed abscission zone (Figures 5D–F). An intense GFP signal was also found at the base of the siliques, which likely corresponds to the silique abscission zone (Figures 5G–I).

REGULATION OF *DES1* EXPRESSION BY EXOGENOUS AUXINS

The spatial distribution of GFP expression conferred by the *DES1* promoter suggests that *DES1* is regulated by the hormone auxin (Teale et al., 2006; Wang et al., 2011; Basu et al., 2013; Baylis et al., 2013). Therefore, we analyzed *DES1* gene expression in response to the exogenous application of auxins. Seeds were germinated directly on indole-3-acetic acid (IAA) at two different concentrations. After 7 days of growth, the level of *DES1* gene expression was determined and compared to the level of gene expression in plants grown in the absence of IAA (Figure 6). We observed a strong and significant reduction in the level of *DES1* expression in the presence of the auxin at a lower concentration of 0.1 μ M. In the same samples, we measured the level of *OAS-A1* gene expression. *OAS-A1* is the cytosolic enzyme that acts in an opposite manner to *DES1*. A strong and significant induction in the expression level of *OAS-A1* was observed (Figure 6).

DISCUSSION

Recent investigations have changed the view of the *A. thaliana* L-Cys desulfhydrase 1 (*DES1*) protein from a minor and auxiliary enzyme belonging to the OASTL protein family to an important and essential enzyme that regulates the homeostasis of cysteine and modulates the generation of sulfide in the



cytosol for signaling purposes (Gotor et al., 2014; Romero et al., 2014). Consequently, knowledge of the tissue-specific localization and regulation of the enzyme will help us to understand the mechanisms underlying the specific functions of *DES1*.

At the protein level, *DES1* has very low abundance; this was confirmed by the identification of a small number of peptides in proteomic analysis (AtProteome Database). The steady-state *DES1* transcript levels are also substantially low. For example, the expression level of the *DES1* gene is approximately two orders of magnitude lower than the *OAS-A1* expression level; this is illustrated in **Figure 6**, and easily verifiable using available web resources (www.arabidopsis.org; www.genevestigator.com). When GFP fluorescence is observed using the promoter-GFP approach, gene expression driven by the *DES1* promoter is relatively high. Fluorescence is mainly observed throughout the whole leaf in early growth stages and in reproductive

tissues. These results suggest that *DES1* is regulated at post-transcriptional or post-translational level. Such a hypothesis makes sense considering the function of this protein in the generation of sulfide in the cytosol to be used for signaling in important processes such as autophagy (Alvarez et al., 2012a; Gotor et al., 2013; Romero et al., 2013). Sulfide is a toxic molecule; in recent years, it has been further recognized as an important signaling molecule in animal and plant systems (Gadalla and Snyder, 2010; Kimura, 2011; Wang, 2012; Garcia-Mata and Lamattina, 2013; Lisjak et al., 2013; Calderwood and Kopriva, 2014; Hancock and Whiteman, 2014). Therefore, sulfide generation activity in the cytosol should be precisely regulated to avoid deleterious effects. Further investigation will be necessary to determine timing, tissue regulation and the players responsible of this sulfide tuning. Sulfide has been implicated in the regulation of other essential process such as stomatal movement (Garcia-Mata and Lamattina,

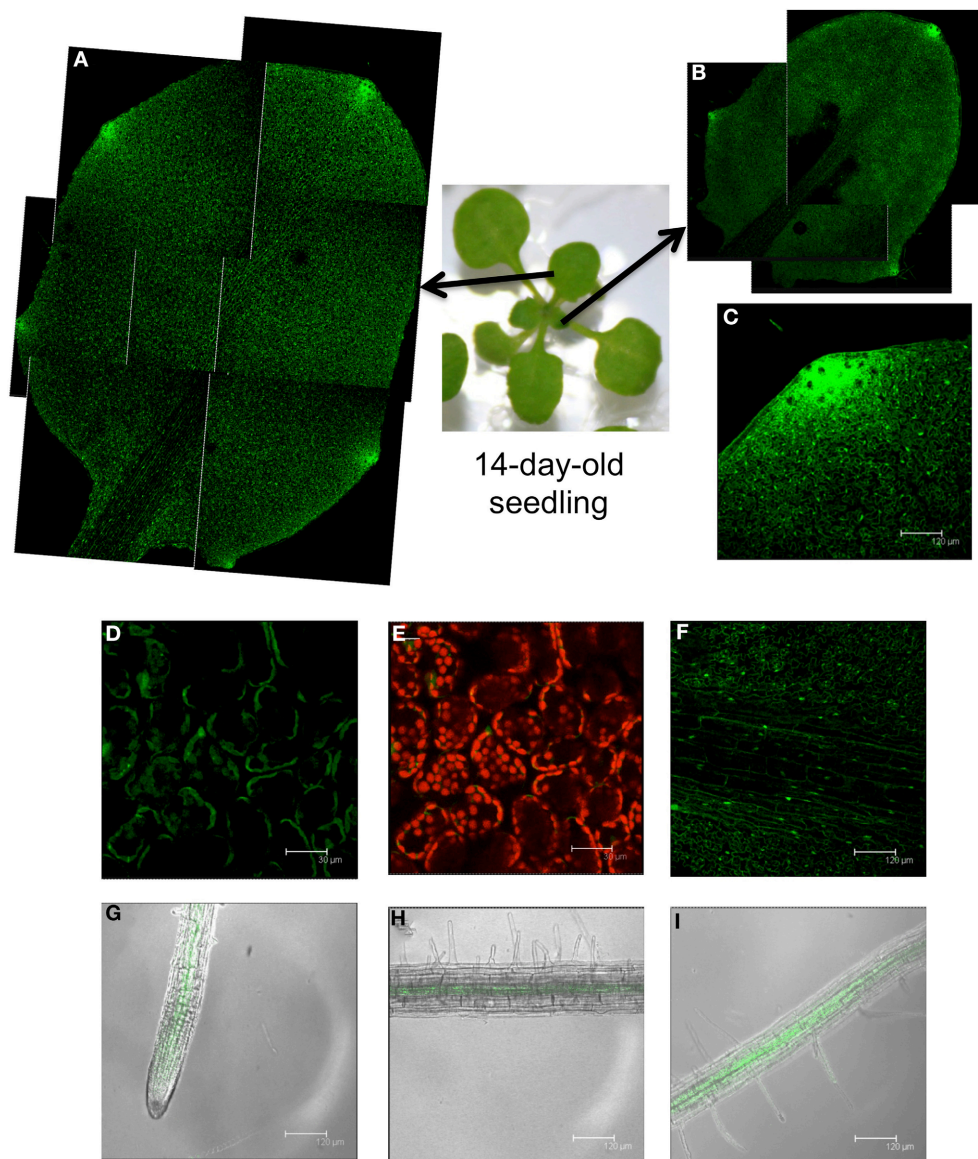


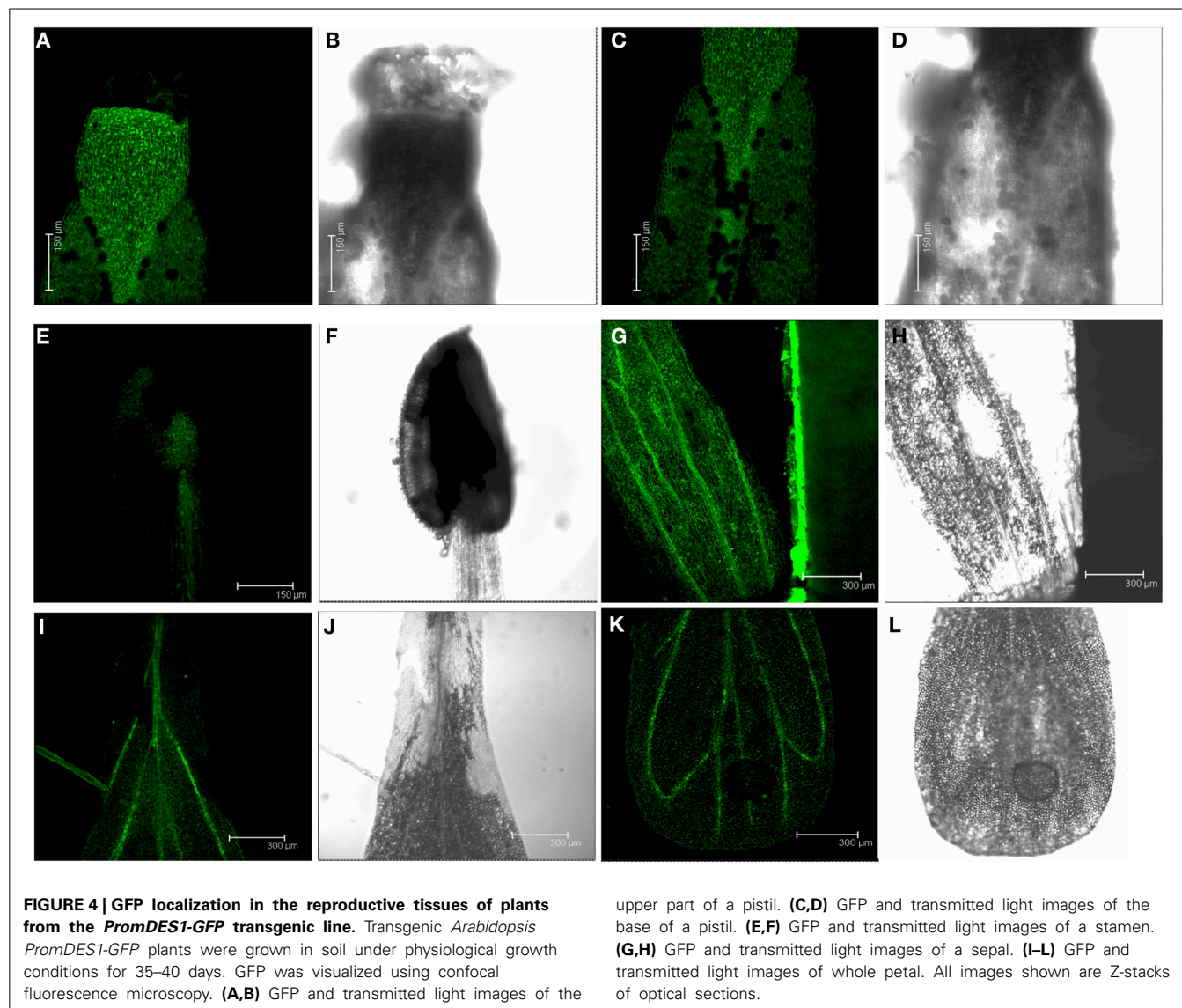
FIGURE 3 | GFP localization in 14-day-old seedlings from the *PromDES1-GFP* transgenic line. Transgenic *Arabidopsis PromDES1-GFP* plants were grown on solid MS plates for 14 days. GFP was visualized using confocal fluorescence microscopy. **(A,B)** Reconstruction of two different leaves from a 14-day-old seedling by joining the GFP images from different

sections. **(C)** GFP image of a hydathode pore. **(D,E)** GFP image and the same image with overlapping red chloroplast autofluorescence of mesophyll cells. **(F)** GFP image of a leaf showing the vascular tissue. **(G–I)** GFP image with overlapping transmitted light image from different root sections. All images shown are Z-stacks of optical sections.

2010; Lisjak et al., 2010). Very recently, the involvement of *DES1* in the ABA-dependent signaling network in guard cells and the requirement for *DES1* in ABA-dependent NO production have been demonstrated (Scuffi et al., 2014). These data suggest that the *DES1* protein may be hormonally regulated and may crosstalk with other signaling molecules.

The present study demonstrates that the maximum *DES1* expression occurs at the initial (seedling) and final (maturity) stages of plant development. This suggests a specific role for *DES1* at these developmental stages. These data fit well with data gathered using *des1* null mutants, in which phenotypic differences

were observed at these stages. ROS production was practically unchanged after cadmium treatment in *des1* mutant seedlings, in contrast with wild type seedlings. Consequently, the *DES1* mutation produces an enhanced tolerance to cadmium and H_2O_2 stress conditions (Alvarez et al., 2010). At maturity, mutation in the *DES1* gene leads to premature leaf senescence and promotes the accumulation and lipidation of the ATG8 protein; ATG8 is typically associated with the induction of autophagy. The transcriptional profile of the *des1* mutant corresponds with the observed premature senescence and induced autophagy phenotypes. Most important, the *DES1* mutation significantly alters the



transcriptional profile at the late growth stage. When transcriptomic analysis was performed using leaves from plants grown for 20 d (growth stage 3.9), only 16 genes in the *des1* mutant were differentially expressed compared to wild type plants. In contrast, the *des1* transcriptional profile changed dramatically compared to wild type in leaves from plants grown for 30 d (growth stage 6.3). The normalized data revealed that 1614 genes were differentially expressed in the mutant compared to the wild type (Alvarez et al., 2012a). Consequently, the function of DES1 seems to be critical at this late growth stage.

An examination of GFP expression driven by the *DES1* promoter in vegetative tissues reveals that the highest GFP signal occurs in the hydathode pores distributed along the margin of the leaf; the number of pores increases with the leaf size. Hydathodes are specialized pore-like structures that act as the exit point in vascular tissues. At these sites, water and ions are released from the xylem. It has also suggested that hydathodes are involved in ion reabsorption to other tissues through the phloem (Nagai et al.,

2013). In addition, the hydathodes are open pores similar to stomata (Nagai et al., 2013). The *Arabidopsis* basic helix-loop-helix (bHLH) protein MUTE, which is a master regulator of stomatal differentiation, is also required for the production of hydathodes (Pillitteri et al., 2008). We have detected a significant GFP fluorescence signal localized to the cytoplasm of guard cells, which suggests the DES1 protein or the sulfide generated by DES1 has a specific function in these pore structures in *Arabidopsis* leaves. This suggestion is reinforced by our recent findings that show DES1 is required for ABA-dependent stomatal closure and the sulfide generated by DES1 acts upstream of nitric oxide in this signaling network (Scuffi et al., 2014).

The *DES1* promoter also confers strong GFP expression inside the trichomes; this result supports numerous reports that have demonstrated the significance of this cell type in relation to sulfur metabolism. *In situ* hybridization studies in combination with determinations of glutathione content by confocal microscopy demonstrated that highly active glutathione biosynthesis occurs

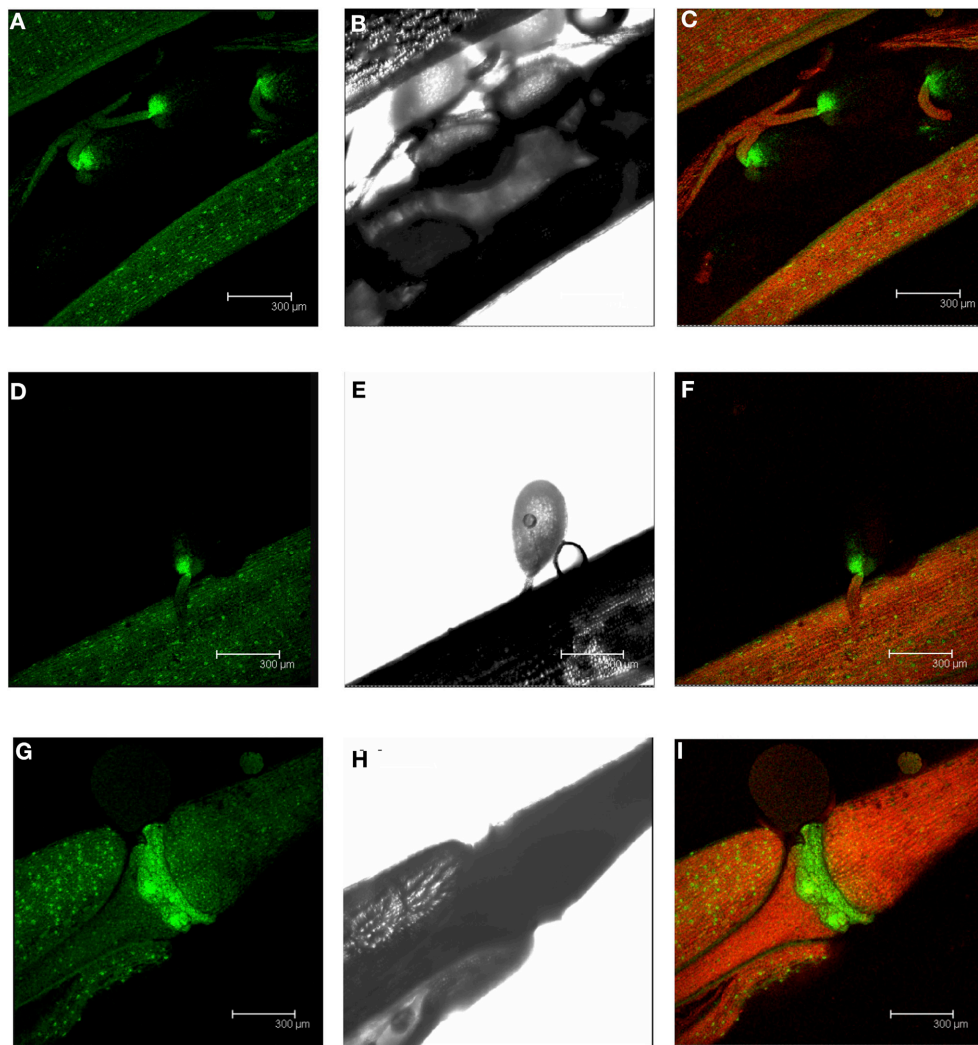


FIGURE 5 | GFP localization in developing siliques of plants from the *PromDES1-GFP* transgenic line. Transgenic *Arabidopsis PromDES1-GFP* plants were grown in soil under physiological growth conditions for 40 days. GFP was visualized using confocal fluorescence microscopy. **(A–C)** GFP image, transmitted light image, the same GFP image with overlapping transmitted light and red chloroplast autofluorescence image of a developing

silique containing several immature seeds. **(D–F)** GFP image, transmitted light image, the same GFP image with overlapping transmitted light and red chloroplast autofluorescence image of an immature seed. **(G–I)** GFP image, transmitted light image, the same GFP image with overlapping transmitted light and red chloroplast autofluorescence image in the abscission zone of a silique. All images shown are Z-stacks of optical sections.

in *Arabidopsis* trichome cells (Gotor et al., 1997; Gutierrez-Alcala et al., 2000). Furthermore, protein profiling performed in this specific cell type also identified an important number of proteins involved in sulfur metabolism (Wienkoop et al., 2004). This trichome-specific expression driven by the *DES1* promoter is similar to expression driven by the *OAS-A1* promoter (Gutierrez-Alcala et al., 2005). These findings suggest that, in this cell type, the homeostasis of cysteine is important and is modulated by the enzymes OAS-A1 and DES1; OAS-A1 catalyzes the synthesis of cysteine and DES1 catalyzes the degradation of cysteine.

In this work, a detailed analysis of the expression of a reporter gene driven by the promoter of a gene encoding an enzyme involved in plant sulfur assimilation was performed for the first

time. The localization of reporter expression conferred by such promoters in reproductive tissues was previously unknown. In open flowers, the *DES1* promoter confers high GFP expression, which occurs mainly in the pistil, sepal, and petal. Weaker GFP signals were observed in the stamen. The presence of *OAS-A1* transcripts was also detected in flowers by *in situ* hybridizations; this finding was analogous to our observations in trichomes (Gotor et al., 1997).

When siliques were analyzed, strong GFP fluorescence was detected in the presumed abscission zones at the bases of the siliques and seeds. Cell separation is a process highly regulated by plant hormones. Ethylene, JA, and ABA act together to regulate organ abscission (Ogawa et al., 2009). Auxin is also involved in many abscission events (Basu et al., 2013).

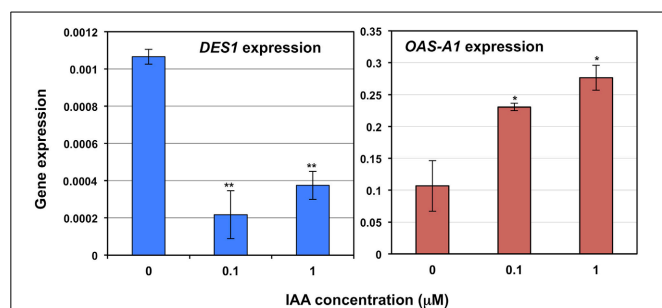


FIGURE 6 | The effect of exogenous auxins on the expression levels of *DES1* and *OAS-A1* genes in wild type plants. Wild type *Arabidopsis* plants were grown on solid MS plates for 7 days in either the absence or presence of IAA at the indicated concentrations. Whole seedlings were then collected for real-time RT-PCR analysis. The *DES1* and *OAS-A1* transcript levels were normalized to the internal control, the constitutively expressed *UBQ10* gene. Data shown are mean values \pm SD from three independent analyses. The one-factor analysis of variance (ANOVA) statistical analysis of the data was performed using the program OriginPro 7.5. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

In general, the tissue-specific expression pattern of GFP conferred by the *DES1* promoter supports the hormonal regulation of *DES1*. We have identified cis-elements located within the promoter sequence that correlate with specific hormonal regulation; these include ABA response elements (DPBF binding site motifs), drought response elements (DRE-like promoter motifs), and auxin response elements (ARF1 binding site motifs), and several stress-responsive binding site motifs. The *DES1* promoter also contains a number of light responsive elements, regulatory elements involved in flowering, such as the LFY consensus binding site motif, and numerous RAV1-A binding site motifs involved in leaf maturation and senescence. The presence of these motifs in the *DES1* promoter corroborates the transcriptomic data from *des1* null mutants, which suggest *DES1* plays an important role in mature plants.

The guard cell-specific expression of GFP suggests that *DES1* is regulated by ABA, and this finding has been recently demonstrated when the stomatal closure in *des1* null mutants was analyzed (Scuffi et al., 2014). Wild type plants closed the stomata in response to exogenous ABA, and *des1* mutants were unable to close the stomata. This lack of response to ABA in *des1* mutants was restored by genetic complementation or by the exogenous application of sulfide. Taken together, these data indicate that *DES1* is required for ABA-dependent stomatal closure. It has been demonstrated that *DES1* is regulated by ABA at the transcriptional level, specifically in guard cells (Scuffi et al., 2014). Interestingly, it was also observed that the *OAS-A1* regulation in response to salt stress is mediated by ABA (Barroso et al., 1999).

GFP expression driven by the *DES1* promoter localizes to sites of high auxin concentration, such as hydathodes (Teale et al., 2006; Wang et al., 2011). This suggests that *DES1* may be regulated by auxin, however, we do not observe any root phenotype in the *des1* mutants. At the transcriptional level, we have observed clear repression in the *DES1* transcript level in response to the exogenous application of auxins; the opposite behavior

was observed with the *OAS-A1* transcript. The GFP accumulation pattern seems contradictory with the down regulation of *DES1* gene expression by auxin. However, the mechanisms controlling auxin action are very complex and involve auxin biosynthesis, conjugation, catabolism, and transport. At present, we are unable to decipher the specific aspect where *DES1* is involved, although we suggest a crosstalk between *DES1* and the auxin-signaling pathway.

Auxin regulates a variety of physiological and developmental processes in plants, including senescence. However, different lines of evidence suggest that auxin delays senescence (Lim et al., 2010; Kim et al., 2011) and other evidence suggest that auxin promotes senescence (Hou et al., 2013). Regardless, the premature leaf senescence phenotype observed in the *des1* mutants and also the transcriptional profile that shows the altered expression of auxin-responsive and small auxin up-regulated (SAUR) genes suggest that *DES1* is regulated by auxin (Gene Expression Omnibus repository GSE32566) (Alvarez et al., 2012a).

The regulatory relationship between sulfur signaling and auxins was previously demonstrated by analyzing the transcriptional responses of plants to sulfur deficiency. The genes involved in the auxin biosynthesis pathway are up-regulated under sulfur deficiency; this suggests that auxin is involved in the sulfur starvation response (Hirai et al., 2003; Nikiforova et al., 2003). Different sulfur starvation response factors related to auxin signaling have been analyzed, and it was concluded that auxin-related transcriptional regulators coordinate the metabolic shifts induced by sulfur starvation (Falkenberg et al., 2008).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded in part by the European Regional Development Fund through the Ministerio de Economía y Competitividad (grant no. BIO2013-44648-P) and the Junta de Andalucía (grant no. CVI-7190). Ana M. Laureano-Marín thanks the Ministerio de Economía y Competitividad for fellowship support through the Formación de Personal Investigador program. We thank Dr. Alicia Orea for confocal microscopy service.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fpls.2014.00683/abstract>

REFERENCES

- Alvarez, C., Calo, L., Romero, L. C., García, I., and Gotor, C. (2010). An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152, 656–669. doi: 10.1104/pp.109.147975
- Alvarez, C., García, I., Moreno, I., Perez-Perez, M. E., Crespo, J. L., Romero, L. C., et al. (2012a). Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 4621–4634. doi: 10.1105/tpc.112.105403
- Alvarez, C., García, I., Romero, L. C., and Gotor, C. (2012b). Mitochondrial sulfide detoxification requires a functional isoform O-acetylserine(thiol)lyase C in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 5, 1217–1226. doi: 10.1093/mp/sss043
- Barroso, C., Romero, L. C., Cejudo, F. J., Vega, J. M., and Gotor, C. (1999). Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 40, 729–736. doi: 10.1023/A:1006285016296

- Basu, M. M., Gonzalez-Carranza, Z. H., Azam-Ali, S., Tang, S., Shahid, A. A., and Roberts, J. A. (2013). The manipulation of auxin in the abscission zone cells of *Arabidopsis* flowers reveals that indoleacetic acid signaling is a prerequisite for organ shedding. *Plant Physiol.* 162, 96–106. doi: 10.1104/pp.113.216234
- Baylis, T., Cierlik, I., Sundberg, E., and Mattsson, J. (2013). SHORT INTERNODES/STYLISH genes, regulators of auxin biosynthesis, are involved in leaf vein development in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 197, 737–750. doi: 10.1111/nph.12084
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., et al. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13, 1499–1510. doi: 10.1105/tpc.13.7.1499
- Calderwood, A., and Kopriwa, S. (2014). Hydrogen sulfide in plants: from dissipation of excess sulfur to signaling molecule. *Nitric Oxide.* 41, 72–78. doi: 10.1016/j.niox.2014.02.005
- Clough, S. J., and Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
- Curtis, M. D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133, 462–469. doi: 10.1104/pp.103.027979
- Falkenberg, B., Witt, I., Zanor, M. I., Steinhauser, D., Mueller-Roeber, B., Hesse, H., et al. (2008). Transcription factors relevant to auxin signalling coordinate broad-spectrum metabolic shifts including sulphur metabolism. *J. Exp. Bot.* 59, 2831–2846. doi: 10.1093/jxb/ern144
- Gadalla, M. M., and Snyder, S. H. (2010). Hydrogen sulfide as a gaso-transmitter. *J. Neurochem.* 113, 14–26. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06580.x
- Garcia, I., Castellano, J. M., Vioque, B., Solano, R., Gotor, C., and Romero, L. C. (2010). Mitochondrial {beta}-cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22, 3268–3279. doi: 10.1105/tpc.110.076828
- Garcia-Mata, C., and Lamattina, L. (2010). Hydrogen sulphide, a novel gaso-transmitter involved in guard cell signalling. *New Phytol.* 188, 977–984. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03465.x
- Garcia-Mata, C., and Lamattina, L. (2013). Gasotransmitters are emerging as new guard cell signaling molecules and regulators of leaf gas exchange. *Plant Sci.* 201–202, 66–73. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.11.007
- Gotor, C., Cejudo, F. J., Barroso, C., and Vega, J. M. (1997). Tissue-specific expression of ATCYS-3A, a gene encoding the cytosolic isoform of O-acetylserine(thiol)lyase in *Arabidopsis*. *Plant J.* 11, 347–352. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11020347.x
- Gotor, C., Garcia, I., Crespo, J. L., and Romero, L. C. (2013). Sulfide as a signaling molecule in autophagy. *Autophagy* 9, 609–611. doi: 10.4161/autophagy.23460
- Gotor, C., Laureano-Marín, A. M., Moreno, I., Aroca, A., García, I., and Romero, L. C. (2014). Signaling in the plant cytosol: cysteine or sulfide? *Amino Acids*. doi: 10.1007/s00726-014-1786-z. [Epub ahead of print]
- Gutierrez-Alcala, G., Calo, L., Gros, F., Caissard, J. C., Gotor, C., and Romero, L. C. (2005). A versatile promoter for the expression of proteins in glandular and non-glandular trichomes from a variety of plants. *J. Exp. Bot.* 56, 2487–2494. doi: 10.1093/jxb/eri241
- Gutierrez-Alcala, G., Gotor, C., Meyer, A. J., Fricker, M., Vega, J. M., and Romero, L. C. (2000). Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11108–11113. doi: 10.1073/pnas.190334497
- Hancock, J. T., and Whiteman, M. (2014). Hydrogen sulfide and cell signaling: team player or referee? *Plant Physiol. Biochem.* 78, 37–42. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.02.012
- Hirai, M. Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M., and Saito, K. (2003). Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA microarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J.* 33, 651–663. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01658.x
- Hou, K., Wu, W., and Gan, S. S. (2013). SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161, 1002–1009. doi: 10.1104/pp.112.212787
- Kabil, O., and Banerjee, R. (2010). Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J. Biol. Chem.* 285, 21903–21907. doi: 10.1074/jbc.R110.128363
- Kim, J. I., Murphy, A. S., Baek, D., Lee, S. W., Yun, D. J., Bressan, R. A., et al. (2011). YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62, 3981–3992. doi: 10.1093/jxb/err094
- Kimura, H. (2011). Hydrogen sulfide: its production and functions. *Exp. Physiol.* 96, 833–835. doi: 10.1113/expphysiol.2011.057455
- Krueger, S., Niehl, A., Lopez Martin, M. C., Steinhauser, D., Donath, A., Hildebrandt, T., et al. (2009). Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 32, 349–367. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01928.x
- Lim, P. O., Lee, I. C., Kim, J., Kim, H. J., Ryu, J. S., Woo, H. R., et al. (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J. Exp. Bot.* 61, 1419–1430. doi: 10.1093/jxb/erq010
- Lisjak, M., Srivastava, N., Teklic, T., Civale, L., Lewandowski, K., Wilson, I., et al. (2010). A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 931–935. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.09.016
- Lisjak, M., Teklic, T., Wilson, I. D., Whiteman, M., and Hancock, J. T. (2013). Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule? *Plant Cell Environ.* 36, 1607–1616. doi: 10.1111/pce.12073
- Nagai, M., Ohnishi, M., Uehara, T., Yamagami, M., Miura, E., Kamakura, M., et al. (2013). Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant Cell Environ.* 36, 1826–1837. doi: 10.1111/pce.12090
- Nikiforova, V., Freitag, J., Kempa, S., Adamik, M., Hesse, H., and Hoefgen, R. (2003). Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J.* 33, 633–650. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01657.x
- Ogawa, M., Kay, P., Wilson, S., and Swain, S. M. (2009). ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 216–233. doi: 10.1105/tpc.108.063768
- Pillitteri, L. J., Bogenschütz, N. L., and Torii, K. U. (2008). The bHLH protein, MUTE, controls differentiation of stomata and the hydathode pore in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 49, 934–943. doi: 10.1093/pcp/pcn067
- Riemenschneider, A., Wegele, R., Schmidt, A., and Papenbrock, J. (2005). Isolation and characterization of a D-cysteine desulphydrase protein from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 272, 1291–1304. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04567.x
- Romero, L. C., Aroca, M. A., Laureano-Marín, A. M., Moreno, I., García, I., and Gotor, C. (2014). Cysteine and cysteine-related signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 7, 264–276. doi: 10.1093/mp/ssl168
- Romero, L. C., García, I., and Gotor, C. (2013). L-Cysteine Desulphydrase 1 modulates the generation of the signaling molecule sulfide in plant cytosol. *Plant Signal. Behav.* 8:e24007. doi: 10.4161/psb.24007
- Scuffi, D., Álvarez, C., Laspina, N., Gotor, C., Lamattina, L., and Garcia-Mata, C. (2014). Hydrogen sulfide generated by L-cysteine desulphydrase acts upstream of nitric oxide to modulate ABA-dependent stomatal closure. *Plant Physiol.* 166, doi: 10.1104/pp.114.245373. [Epub ahead of print]
- Seibel, N. M., Eljouni, J., Nalaskowski, M. M., and Hampe, W. (2007). Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal. Biochem.* 368, 95–99. doi: 10.1016/j.ab.2007.05.025
- Takahashi, H., Kopriwa, S., Giordano, M., Saito, K., and Hell, R. (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 157–184. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103921
- Teale, W. D., Paponov, I. A., and Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 847–859. doi: 10.1038/nrm2020
- Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.* 92, 791–896. doi: 10.1152/physrev.00017.2011

- Wang, W., Xu, B., Wang, H., Li, J., Huang, H., and Xu, L. (2011). YUCCA genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. *Plant Physiol.* 157, 1805–1819. doi: 10.1104/pp.111.186395
- Wienkoop, S., Zoeller, D., Ebert, B., Simon-Rosin, U., Fisahn, J., Glinski, M., et al. (2004). Cell-specific protein profiling in *Arabidopsis thaliana* trichomes: identification of trichome-located proteins involved in sulfur metabolism and detoxification. *Phytochemistry* 65, 1641–1649. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.03.026

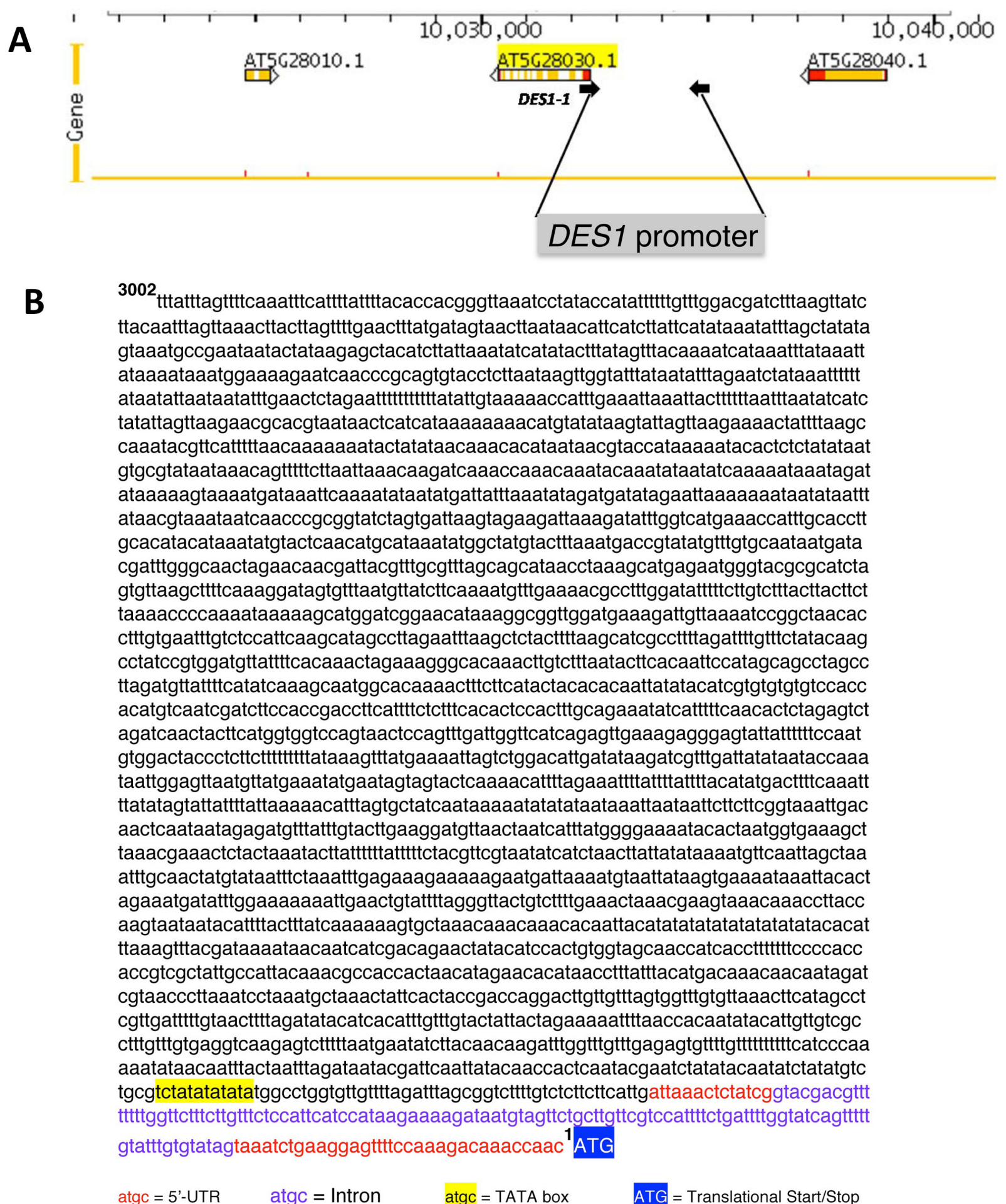
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 29 October 2014; accepted: 16 November 2014; published online: 04 December 2014.

Citation: Laureano-Marín AM, García I, Romero LC and Gotor C (2014) Assessing the transcriptional regulation of L-cysteine desulphydrase 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 5:683. doi: 10.3389/fpls.2014.00683

This article was submitted to *Plant Physiology*, a section of the journal *Frontiers in Plant Science*.

Copyright © 2014 Laureano-Marín, García, Romero and Gotor. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Supplemental Figure 1. Schematic representation of the intergenic sequence between *DES1* and the previous gene, and nucleotide sequence of the *DES1* promoter.

(A) Diagram of *DES1* promoter position in chromosome 5 of Arabidopsis's genome (www.arabidopsis.org). Yellow arrows indicate transcription direction of different genes. Dark arrows indicate designed oligonucleotides position for promoter isolation. (B) Nucleotide sequence of the *DES1* promoter where the immediate upstream nucleotide of the start codon is designated as position 1.

Capítulo II

La regulación negativa de la autofagia por el sulfuro es independiente de las especies reactivas del oxígeno

Running head: ROS-independent sulfide regulation of autophagy

Correspondence: Cecilia Gotor. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad de Sevilla. Avenida Américo Vespucio, 49, 41092 Sevilla, Spain. Tel: 34.954489516. Email: gotor@ibvf.csic.es

Research area:

Negative regulation of autophagy by sulfide in *Arabidopsis thaliana* is independent of reactive oxygen species

Ana M. Laureano-Marín, Inmaculada Moreno, Luis C. Romero, Cecilia Gotor

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad de Sevilla, Avenida Américo Vespucio, 49, 41092 Sevilla, Spain

Summary:

Sulfide, but not other sulfur-containing molecules, represses autophagy irrespective of the redox conditions.

25 **Footnotes:**

26

27 This work was funded in part by the European Regional Development Fund through the
28 Ministerio de Economía y Competitividad (grant MOLCIS, no. BIO2013-44648-P) and the
29 Junta de Andalucía (grant no. CVI-7190). A.M.L-M. thanks the Ministerio de Economía y
30 Competitividad for fellowship support through the program of Formación de Personal
31 Investigador.

32

33

34

ABSTRACT

Accumulating experimental evidence in mammalian - and recently plant - systems has led to a change in our understanding of the role played by hydrogen sulfide in life processes. In plants, hydrogen sulfide mitigates stress and regulates important plant processes such as photosynthesis, stomatal movement and autophagy, although the underlying mechanism is not well known. In this study, we provide new experimental evidence that, together with our previous findings, demonstrates the role of hydrogen sulfide in regulating autophagy. We used GFP fluorescence associated with autophagic bodies and immunoblot analysis of the ATG8 protein to show that sulfide (and no other molecules such as sulfur-containing molecules or ammonium) was able to inhibit the autophagy induced in *Arabidopsis thaliana* roots under nitrogen deprivation. Our results showed that sulfide was unable to scavenge reactive oxygen species generated by nitrogen limitation, in contrast to well-established reducers. In addition, reducers were unable to inhibit the accumulation of autophagic bodies and ATG8 protein forms to the same extent as sulfide. Therefore, we conclude that sulfide represses autophagy via a mechanism that is independent of redox conditions.

INTRODUCTION

Historically, sulfide has been considered to be a toxic molecule that is hazardous to life and the environment. However, hydrogen sulfide is currently recognized as an important signaling molecule that functions as a physiological gasotransmitter and is of comparable importance to NO and CO in mammalian systems. The number of biological roles of sulfide has rapidly expanded in recent times and is the subject of many reviews that have emphasized the physiological importance of sulfide because most mammalian cells produce and metabolize sulfide in a precise and regulated manner (Szabo, 2007; Li and Moore, 2008; Gadalla and Snyder, 2010; Kimura, 2011; Wang, 2012). Accumulating evidence from numerous studies in plant biology have also shown that hydrogen sulfide is a signaling molecule that can be as important as NO and H₂O₂; thus, hydrogen sulfide has also been the subject of several recent reviews (Garcia-Mata and Lamattina, 2013; Lisjak et al., 2013). Sulfide has been found to mediate increases in tolerance and protection against certain plant stresses, primarily through the increased performance of antioxidant defenses. For example, sulfide alleviates the inhibitory effects of copper and aluminum stress on wheat germination and barley seedlings (Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2010; Dawood et al., 2012), the effect of boron on cucumber root elongation (Wang et al., 2010), and the toxicity of cadmium in *Populus euphratica* (Sun et al., 2013) and alfalfa seedlings (Li et al., 2012). Sulfide also improves drought and hypoxia resistance and heat and salinity tolerance (Jin et al., 2011; Li et al., 2012; Cheng et al., 2013; Christou et al., 2013). Furthermore, sulfide has been suggested to play a role in regulating photosynthesis and flower senescence and in prolonging the postharvest shelf life of fruits (Chen et al., 2011; Zhang et al., 2011; Hu et al., 2012). Interestingly, hydrogen sulfide has also been identified as a component of the abscisic acid signaling pathway in guard cells (Garcia-Mata and Lamattina, 2010; Lisjak et al., 2010). Recently, it has been demonstrated that sulfide acts upstream of nitric oxide to modulate abscisic acid-dependent stomatal closure (Scuffi et al., 2014). The cross-talk between NO and sulfide has also been suggested based on the induced alleviation of cadmium toxicity in alfalfa seedlings (Li et al., 2012), the improved heat tolerance of maize seedlings (Li et al., 2013) and the enhanced salinity tolerance of alfalfa seeds during germination (Wang et al., 2012). All of these findings clearly demonstrate the importance of sulfide as a signaling molecule that is involved in regulating numerous essential processes in plants.

The endogenous production of hydrogen sulfide in mammalian tissues occurs through the enzymatic reactions of L-cysteine (Szabo, 2007; Li and Moore, 2008; Gadalla and Snyder, 2010; Kimura, 2011; Wang, 2012). In plants, we identified an enzyme, DES1, with L-cysteine desulfhydrase activity that is located in the cytosol of *Arabidopsis thaliana* (Alvarez et al., 2010). This is the only enzyme that has been unequivocally established to catalyze the desulfuration of L-cysteine to sulfide plus ammonia and pyruvate, and therefore, it is responsible for the release of hydrogen sulfide in the plant cytosol. Mutations in the *DES1* gene impede the formation of sulfide and strongly affect plant metabolism and stress responses. Thus, the detailed characterization of *des1* null mutants reveals premature leaf senescence, a dramatically altered plant transcriptional profile at the mature developmental stage and the induction of autophagy (Alvarez et al., 2012). The *des1* mutants also present increased tolerance to conditions that promote oxidative stress, a high resistance to biotrophic and necrotrophic pathogens, salicylic acid accumulation and *WRKY DOMAIN CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR54* and *PATHOGENESIS RELATED1* induction; therefore, *des1* mutants resemble constitutive systemic acquired resistance mutants (Alvarez et al., 2010; Alvarez et al., 2012). Moreover, in *des1* mutants, stomata do not close in response to abscisic acid. This effect is restored by the application of exogenous sulfide or genetic complementation, demonstrating the involvement of DES1 in ABA signaling in guard cells. Further studies have shown that DES1 is required for ABA-dependent NO production (Scuffi et al., 2014). Thus, in plant cells, DES1 could be responsible for modulating the generation of sulfide for important signaling processes (Romero et al., 2013; Gotor et al., 2014) such as autophagy.

Autophagy is a universal mechanism with a pro-survival role in eukaryotic cells and involves the digestion of cell contents to recycle the necessary nutrients or to degrade damaged or toxic components. The most important feature of autophagy (we refer to the macroautophagy) is the *de novo* synthesis of double membrane-bound structures called autophagosomes, which engulf and deliver materials to the vacuole to be broken down. Proteins involved in autophagy (ATG proteins) have been used to monitor autophagic activity in plants; the most commonly used protein is ATG8, which is tethered to autophagosomes by lipidation (Thompson and Vierstra, 2005; Bassham et al., 2006; Bassham, 2007; Yoshimoto et al., 2010; Li and Vierstra, 2012; Yoshimoto, 2012). DES1 deficiency promotes the accumulation and lipidation of ATG8 isoforms in *Arabidopsis* leaves. Because mutation of the

DES1 gene impedes sulfide generation in the cytosol, ATG8 protein accumulation and lipidation is prevented in *des1* mutants when sulfide is generated by genetic complementation or exogenous application. Interestingly, exogenous sulfide also rescues the activation of autophagy that results from dark-induced carbon starvation in wild type Arabidopsis leaf tissues (Alvarez et al., 2012).

The underlying mechanism for transforming the sulfide signal into a biological response is largely unknown. Two mechanisms of action have been proposed based on the chemical properties of H₂S. The nucleophilic properties of sulfide and its capacity to react with different oxygen species and nitrogen oxides suggest that it can act as an antioxidant to reduce oxidative stress (Fukuto et al., 2012). The second mechanism consists of the post-translational modification of the –SH groups of protein cysteines to generate the persulfide group –SSH, and, in this way, alter protein activities or functions (Mustafa et al., 2009; Paul and Snyder, 2012; Aroca et al., 2015).

The aim of this work was to determine the mechanism underlying the regulation of autophagy by sulfide. For this purpose, we have investigated the role of sulfide in the induction of autophagy under nitrogen deprivation.

RESULTS**Sulfide Represses Autophagy when It Is Induced under Nitrogen Deprivation in Arabidopsis Roots**

Previously, we showed that the application of exogenous sulfide rescues the induction of autophagy in Arabidopsis leaves, both in *des1* mutant and in carbon-starved wild type plants, by analyzing the accumulation of ATG8 protein isoforms (Alvarez et al., 2012). These results prompted us to suggest that sulfide generated in the cytosol by DES1 behaves as a repressor of autophagy (Gotor et al., 2013; Romero et al., 2013; Gotor et al., 2014). To complement our previous studies and decipher the mechanism underlying the role of sulfide in autophagy, we established a new experimental system in which autophagy was induced by a different condition, in a different tissue and by using a different molecular tool. Thus, wild type Arabidopsis plants expressing the GFP-ATG8a fusion protein were subjected to nitrogen limitation, and the effects of exogenous sulfide on seedling roots were analyzed by confocal microscopy of the GFP fluorescence. Seedlings were grown for 1 week on nitrogen-sufficient media, and a portion of the seedlings were transferred to fresh nitrogen-rich media. The other seedlings were transferred to media lacking nitrogen, and a third set of seedlings was placed on the same nitrogen-deficient media supplemented with 200 μ M NaHS. After the transfer, the seedlings were grown for an additional 2 or 4 days, and then removed and treated with concanamycin A prior to observing them by confocal microscopy. In the roots of plants grown under nitrogen-rich conditions, we observed fluorescent punctate structures that were previously identified as GFP-ATG8-tagged autophagosomes and autophagic bodies (Yoshimoto et al., 2004; Contento et al., 2005; Thompson et al., 2005; Bassham, 2014; Merkulova et al., 2014). However, when the seedlings were subjected to nitrogen deprivation, independently of the time period, there was an increase in the number of autophagic bodies (Fig. 1), as previously demonstrated (Thompson et al., 2005; Phillips et al., 2008). Therefore, our results indicated that our nitrogen-limited conditions successfully induced autophagy. Interestingly, the presence of NaHS in the media significantly inhibited the accumulation of fluorescent vesicles observed during nitrogen deprivation (Fig. 1). Without concanamycin A treatment, we failed to detect dotted structures; in contrast, we observed diffuse fluorescent staining of only the cytoplasm, with no change in response to nitrogen limitation

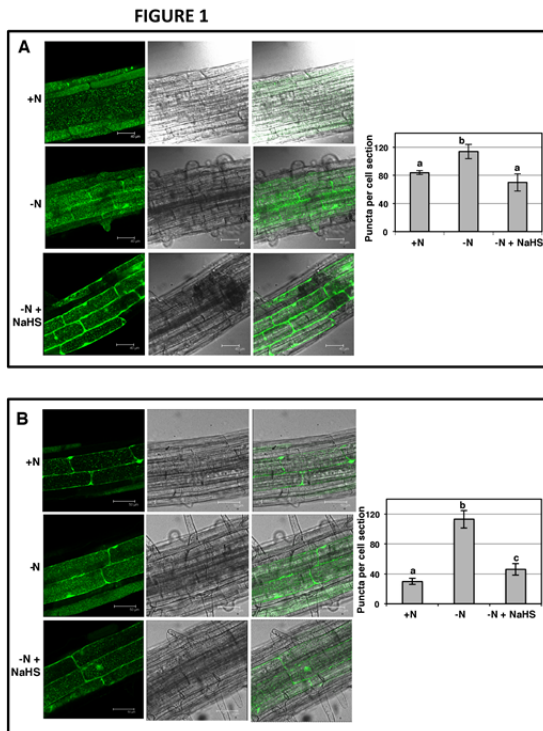


Figure 1. Effect of exogenous sulfide on autophagy induced by nitrogen deprivation in *Arabidopsis* roots. Wild type seedlings expressing GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μ M NaHS (-N + NaHS) for an additional 2 days (A) or 4 days (B). The root cells were visualized by confocal fluorescence microscopy and exposed to concanamycin A prior to observation as described in the Materials and Methods. Representative single optical section of fluorescence, visible and overlaid images are shown. The number of GFP-ATG8 puncta per cell section was determined using PDQuest software as described in the Materials and Methods. Values are the average number (\pm SD) of fluorescent vesicles within the central vacuoles per cell of 25-35 cells in each of the three independent experiments. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

172 (Supplemental Fig. S1).

173 To determine whether the changes in the number of autophagic bodies observed by
 174 confocal microscopy were significant, these structures were quantified using the images of 25

to 35 different cells (Fig. 1). We quantified a large number of fluorescent vesicles per root cell in nitrogen-deprived seedlings, both of which were grown for 2 or 4 additional days, compared with those grown under nitrogen-rich conditions. The number of autophagic bodies was more than 3-fold higher in nitrogen-deficient media than in rich media after 4 additional days of growth. Moreover, the presence of exogenous sulfide produced an important decrease in the number of vesicles that was more significant during a treatment period of 4 days, reaching levels close to those observed in nitrogen-rich media. Both the increase in autophagic bodies under nitrogen-limited conditions and their reduction by exogenous sulfide were statistically significant.

It is important to note that the nitrogen-deficient media used in this study contained all of the sulfate salts at the same concentrations that were present in the MS media and were therefore sulfate-rich media. These results confirmed that sulfide represses autophagy in *Arabidopsis* independently of sulfur limitation.

To establish that the role of sulfide in regulating autophagy was specific to this molecule and therefore different from that of other inorganic sulfur-containing compounds, we performed a similar nitrogen limitation experiment in the presence of different sodium salts for 4 days (Fig. 2A). As expected, the sulfate and sulfite sodium salts that did not release sulfide were unable to reverse the accumulation of autophagic bodies under nitrogen deprivation to the same extent as sulfide. However, both the Na_2S and NaHS treatments produced a similar reduction in the number of autophagic bodies under nitrogen limitation. We concluded that only sulfide donor molecules are responsible for the inhibition of autophagic body accumulation induced by nitrogen deprivation in *Arabidopsis* roots. In addition, we included a treatment with the same concentration of ammonium and under the same nitrogen limitation conditions, and we did not observe a strong inhibition of fluorescent vesicle accumulation similar to that produced by sulfide (Fig. 2A). This result again confirmed that sulfide acts as a signaling molecule during the repression of autophagy. Furthermore, sulfide acted in a dose-dependent manner (Fig. 2B). The effects of sulfide were optimal at 100 to 200 μM NaHS ; higher concentrations of the donor were less effective and even induced an increase in the accumulation of autophagic bodies. Thus, at 400 μM NaHS and nitrogen deprivation, we observed an increase of approximately 20 % in the number of vesicles relative to roots under nitrogen limitation stress alone. This pattern may stem from sulfide toxicity; the generation of reactive sulfur and oxygen species after a certain concentration threshold that

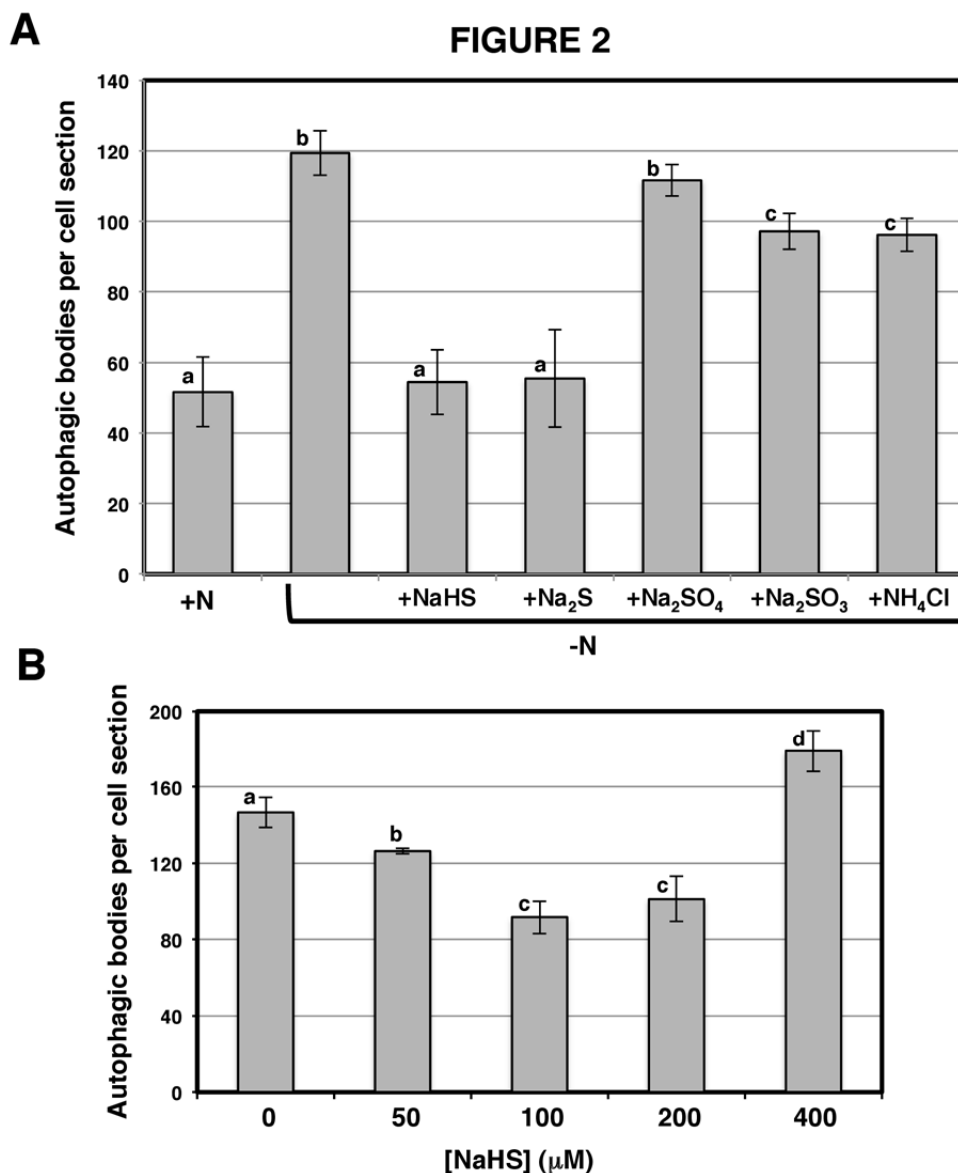


Figure 2. Effect of different chemicals (A) and concentrations (B) on the autophagy induced by nitrogen starvation in *Arabidopsis* roots. Wild type seedlings expressing GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred for an additional 4 days to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μM of different salts as indicated in panel (A); or alternatively to the N-deficient medium containing different concentrations of NaHS as indicated in panel (B). Root cells were visualized by confocal fluorescence microscopy and, prior to observation, were exposed to concanamycin A as described in the Materials and Methods. The number of autophagic bodies per cell section was determined using the PDQuest software as described in the Materials and Methods. Values are the average number ($\pm\text{SD}$) of fluorescent vesicles within the central vacuoles per cell of 25-35 cells in each of the three independent experiments. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

207 results in major oxidative damage, another condition that is known to induce autophagy
 208 (Xiong et al., 2007). We selected concentrations of 100 or 200 μM for further experiments to
 209 avoid any potential toxic effects on seedling growth that were not been observed in previous

experiments.

Sulfide Repression of Autophagy Is Also Observed at the ATG8 Protein Level

We also studied the protein profiles of ATG8 in root protein extracts prepared from seedlings that had been subjected to nitrogen limitation in the presence or absence of sulfide, using the same methods as presented above. We used polyclonal antibodies raised against the recombinant ATG8 protein from *Chlamydomonas reinhardtii*, a method that has been useful for the detection of ATG8 proteins in *Arabidopsis* (Perez-Perez et al., 2010; Alvarez et al., 2012), to detect the GFP-ATG8a fusion protein as well as endogenous ATG8 proteins, and commercial anti-GFP antibodies to detect the fusion protein and the free GFP to show the autophagic flux. Total protein extracts were electrophoresed in 10 % acrylamide gels to detect the GFP-ATG8a fusion protein, or alternatively in 15 % acrylamide gels to detect endogenous ATG8 proteins (Fig. 3). The immunoblot analysis revealed that the anti-GFP antibodies detected an intense protein band that corresponded to the fusion protein. Consistent with previous data, the ATG8 fusion protein level increased in seedling roots under nitrogen deprivation compared with those grown under nitrogen-replete conditions. The presence of sulfide in the nitrogen-deficient medium reduced the accumulation of the ATG8 fusion protein (Fig. 3A, left panel). This observation was reproducible in different experiments, considering the intensity of the bands relative to the total protein loading control. The amount of each immunodetected protein band relative to the loading control was quantified in the three replicates of the experiment and the average is shown in parentheses, with a value of 100 % assigned to the band corresponding to the +N sample. Multivariate analysis of variance (ANOVA) statistical analysis of the data was performed, demonstrating that effect of sulfide on the ATG8 fusion protein accumulation under nitrogen-deficient medium was statistically significant. Interestingly, the anti-GFP antibodies also detected the accumulation of free GFP as previously observed when the same GFP-ATG8a seedlings were subjected to nitrogen starvation conditions (Chung et al., 2010; Suttangkakul et al., 2011; Li et al., 2014). This free GFP released from the fusion protein after autophagic transport into the vacuole correlates with the autophagic flux and represents another marker for the autophagy process. We have to take into account that the GFP-ATG8a transgene is under the control of the strong cauliflower mosaic virus 35S promoter and therefore, the ratio of the fusion protein band intensity to that

FIGURE 3

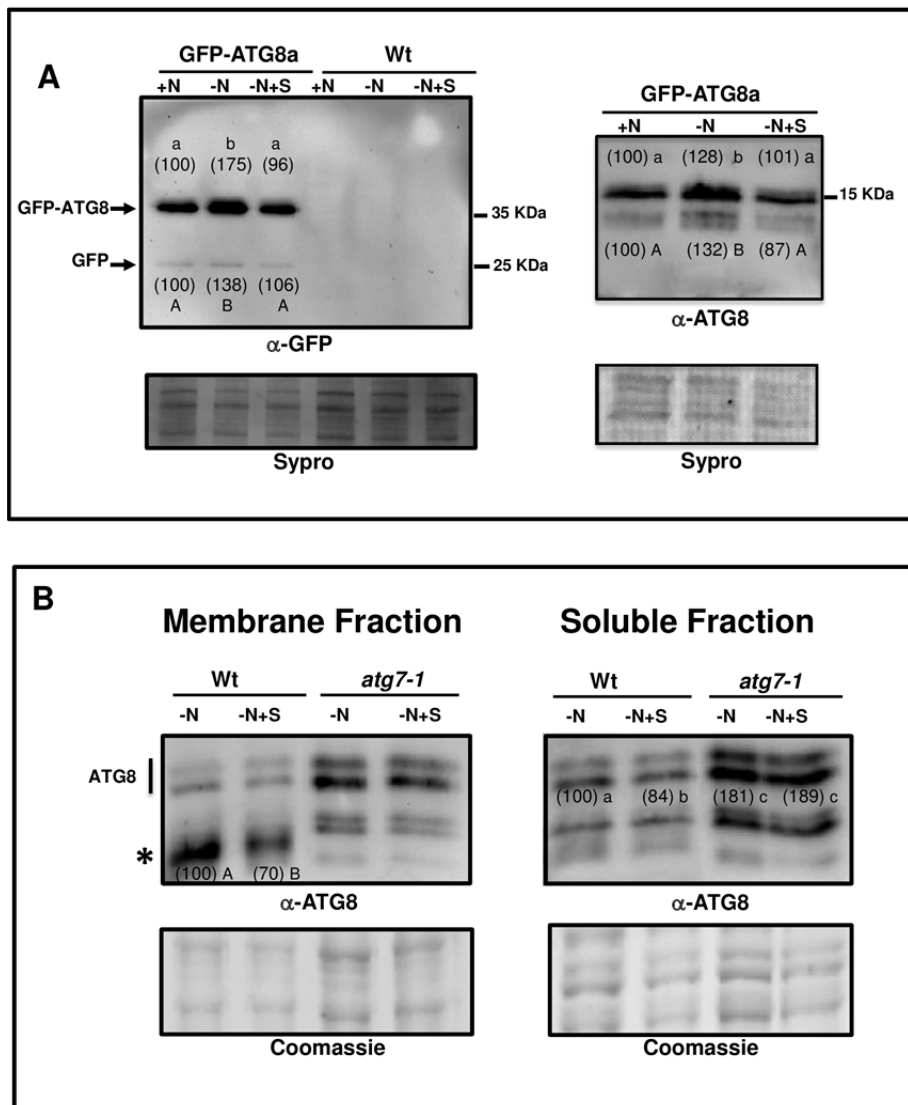


Figure 3. Immunoblot analysis of GFP-ATG8a fusion and endogenous ATG8 protein accumulation in Arabidopsis roots. (A) Wild type and wild type seedlings expressing the GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μ M NaHS (-N + S) for an additional 4 days. Total protein extracts were prepared from roots as described in the Materials and Methods, and 3 μ g of each extract was resolved by 10 % SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis with anti-GFP antibodies (left panel); and 20 μ g of each extract was resolved by 15 % SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis with anti-ATG8 (right panel). As the protein loading control, before immunodetection, the membrane was stained with SYPRO Ruby. The experiment was repeated three times and representative images are shown. The amount of each immunodetected protein band relative to the loading control was quantified in the three replicates of the experiment, and the average is shown in parentheses, with a value of 100 % assigned to the band corresponding to the +N sample. (B) Wild type and *atg7-1* mutant seedlings were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μ M NaHS (-N + S) for an additional 4 days. Total protein extracts were prepared from roots and membrane and soluble fractions were separated by centrifugation as described in the Materials and Methods, and 15 μ L of each fraction was resolved by 15 % SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis with anti-ATG8. As the protein loading control, a gel was run in parallel and stained with Coomassie Brilliant Blue. In the membrane fraction, the amount of the lipidated ATG8 protein band (shown with an asterisk) was quantified relative to the loading control, with a value of 100 % assigned to the band corresponding to the -N sample of the wild type. In the soluble fraction, all together immunodetected protein bands were quantified relative to the loading control, with a value of 100 % assigned to the band corresponding to the -N sample of the wild type. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

of the free GFP is higher than the one expected (Shin et al., 2014). We also found that the level of free GFP accumulation decreased in the presence of sulfide in the nitrogen-deficient medium (Fig. 3A, left panel), reflecting a repression of the autophagic flux by this molecule.

To corroborate that the free GFP bands were specific and therefore were correlated with the autophagic fluxes, in parallel, immunoblot analysis of wild type seedling roots subjected to the same conditions was performed. None band was detected using the anti-GFP antibodies, excluding the possibility of nonspecific bands (Fig. 3A, left panel).

Our results indicated that the GFP-ATG8a fusion protein accumulated in nitrogen-deficient conditions and that the presence of sulfide reduced its accumulation. However, we might expect that the GFP-ATG8a protein were degraded via autophagy and therefore observe a decrease in the amount of the fusion protein. The reason of this apparent contradiction is due to our experimental design in the following way. To perform the SDS-PAGE with the best loading control as possible, protein samples were diluted to the same concentration to ensure equal loading of the samples. However, a detailed observation of the protein concentration quantified in each extract showed that systematically the protein concentration of total protein extracts prepared from roots grown on nitrogen-deficient media were lower than of the extracts in nitrogen-rich conditions and of those in nitrogen-deficient conditions containing sulfide (Supplemental Table S1). Differences in protein concentrations were also observed when the protein extracts from the aerial part of the same seedlings were subjected to SDS-PAGE, mainly in the Rubisco large subunit protein band intensity (Supplemental Fig. S2). The net degradation of cellular proteins has been already observed in tobacco cells cultured in sucrose starvation and was concluded to be due to autophagy (Moriyasu and Ohsumi, 1996; Takatsuka et al., 2004). Our data again reinforced the conclusion that sulfide represses autophagy.

When the immunoblot analysis was performed to specifically detect endogenous ATG8 proteins in the root protein extracts from seedlings expressing GFP-ATG8a, nearly identical results were obtained (Fig. 3A, right panel). Two groups of ATG8 proteins were detected using the anti-Cr-ATG8 antibodies that should correspond to the unmodified ATG8 protein forms and the conjugated ATG8-PE proteins, as previously observed in Arabidopsis (Phillips et al., 2008; Chung et al., 2010; Alvarez et al., 2012). To confirm that the bands with faster mobility represented ATG8-PE adducts, we performed membrane fractionation on both the wild type and *atg7-1* backgrounds. In the *atg7-2* mutant, ATG8 lipidation is blocked and thus the ATG8-PE adducts are absent (Chung et al., 2010; Suttangkakul et al., 2011). By centrifugal separation of protein extracts prepared from wild type and *atg7-1* seedlings that had been subjected to nitrogen limitation in the presence or absence of sulfide, we obtained

membrane and soluble protein fractions that were subjected to immunoblot analysis (Fig. 3B). When the protein profiles were compared, we observed protein bands with faster mobility enriched in the membrane fraction of wild type that were absent in the *atg7-1* background (shown by an asterisk). Moreover, consistent with these proteins representing the ATG8-PE adducts, they were absent in both the wild type and the *atg7-1* soluble protein fractions. Other protein bands observed in the membrane fractions correspond to contamination of the soluble fractions. The SDS-PAGE profiles also showed the reversal of the accumulation of both types of ATG8 protein, in the soluble fraction and in the membrane fraction of wild type, in nitrogen-limited root seedlings when exogenous sulfide was present in the media. Curiously, the sulfide reduction of ATG8 protein accumulation was not observed in *atg7-1* fractions. Collectively, these results provide evidence that sulfide regulates autophagy also under conditions of nitrogen deprivation. Our results confirmed this role at cellular and protein levels.

The Mechanism of Autophagy Reversion via Sulfide is Not Dependent on its Antioxidant Activity

Several reports have suggested that exogenous hydrogen sulfide increases the antioxidant capability of plant cells, thereby alleviating oxidative damage induced by plant stresses. This finding has led researchers to question whether sulfide functions as a signaling molecule (Hancock and Whiteman, 2014). Oxidative stress has been shown to induce autophagy (Xiong et al., 2007; Perez-Perez et al., 2012; Perez-Martin et al., 2014), especially under conditions of nutrient limitation, in which the induction of autophagy has been suggested to involve reactive oxygen species (ROS) (Liu et al., 2009). To determine whether the effect of sulfide on the induction autophagy was mediated by H_2O_2 scavenging, we performed the same nitrogen deprivation experiment in the presence of sulfide or any of the established antioxidants glutathione and ascorbate (Foyer and Noctor, 2011), except that the roots were specifically stained for hydrogen peroxide (Fig. 4). After 4 days of growth on nitrogen-deficient media, we clearly observed an increase in fluorescence emission (pseudocolored in green) in the roots of the seedlings that resulted from oxidation of the nonfluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) to the fluorescent product. This result suggested that H_2O_2 was being produced at high rates. In contrast, the fluorescence emission was nearly undetectable in roots from plants grown under nitrogen-rich conditions.

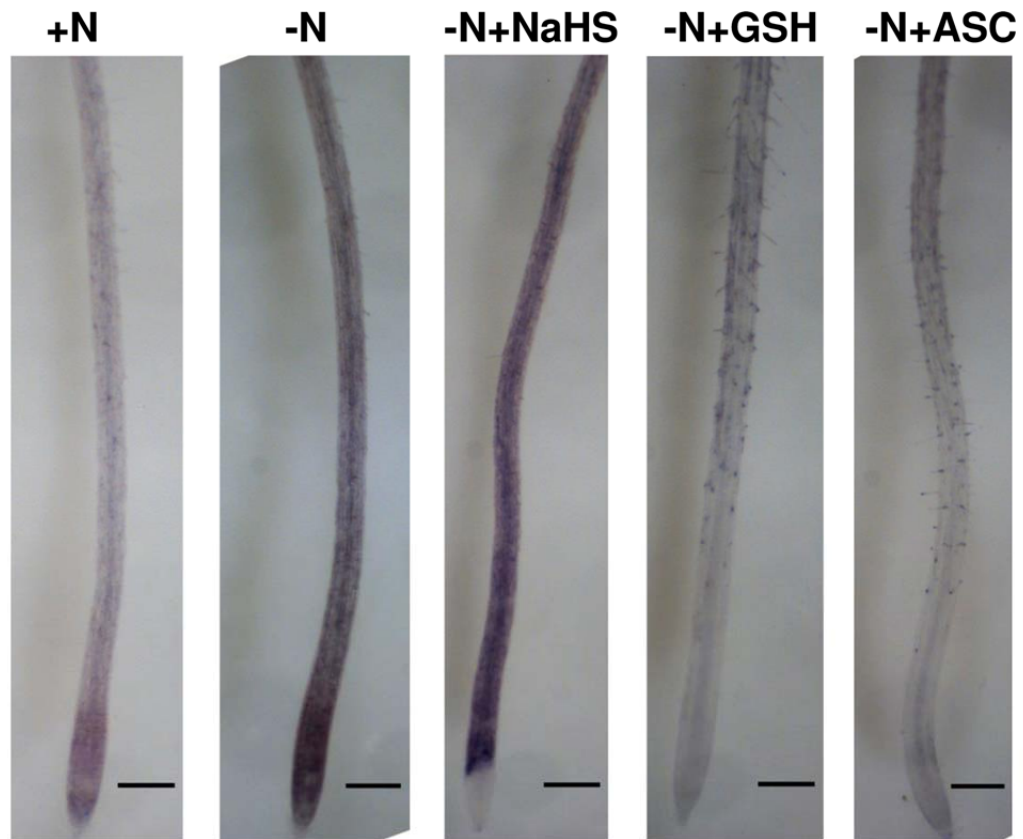


Figure 5. Detection of superoxide in Arabidopsis roots. Wild type seedlings were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing either 200 μ M NaHS (-N + NaHS), or GSH (-N + GSH), or ascorbate (-N + ASC) for an additional 4 days. The roots were stained with NBT as described in Materials and Methods. Representative images are shown. Bars= 250 μ m.

309 Interestingly, the presence of 200 μ M NaHS in the nitrogen-deficient growth media did not
 310 have any effect on the intensity of the fluorescence emission. A similar signal was observed
 311 compared with roots grown under conditions of nitrogen starvation. Furthermore, when the

312 nitrogen-deficient media were supplemented with either 200 μ M of reduced glutathione or
313 ascorbate, a decrease in the fluorescent signal was observed, reaching the same signal intensity
314 as observed under nitrogen-sufficient conditions, as expected for well-known antioxidants.

315 These findings showed that hydrogen sulfide does not behave as a H_2O_2 scavenger in our
316 conditions. We cannot exclude that other ROS different to H_2O_2 might mediate the repressive
317 effect of sulfide. Such is the case of the superoxide radical anion, whose function in root

318 development is well established (Foreman et al., 2003). Consequently, superoxide production
319 was also visualized by nitroblue tetrazolium staining of the same root tissues and basically the
320 same results were obtained (Fig. 5). The dark-blue stain due to the superoxide was observed

FIGURE 4

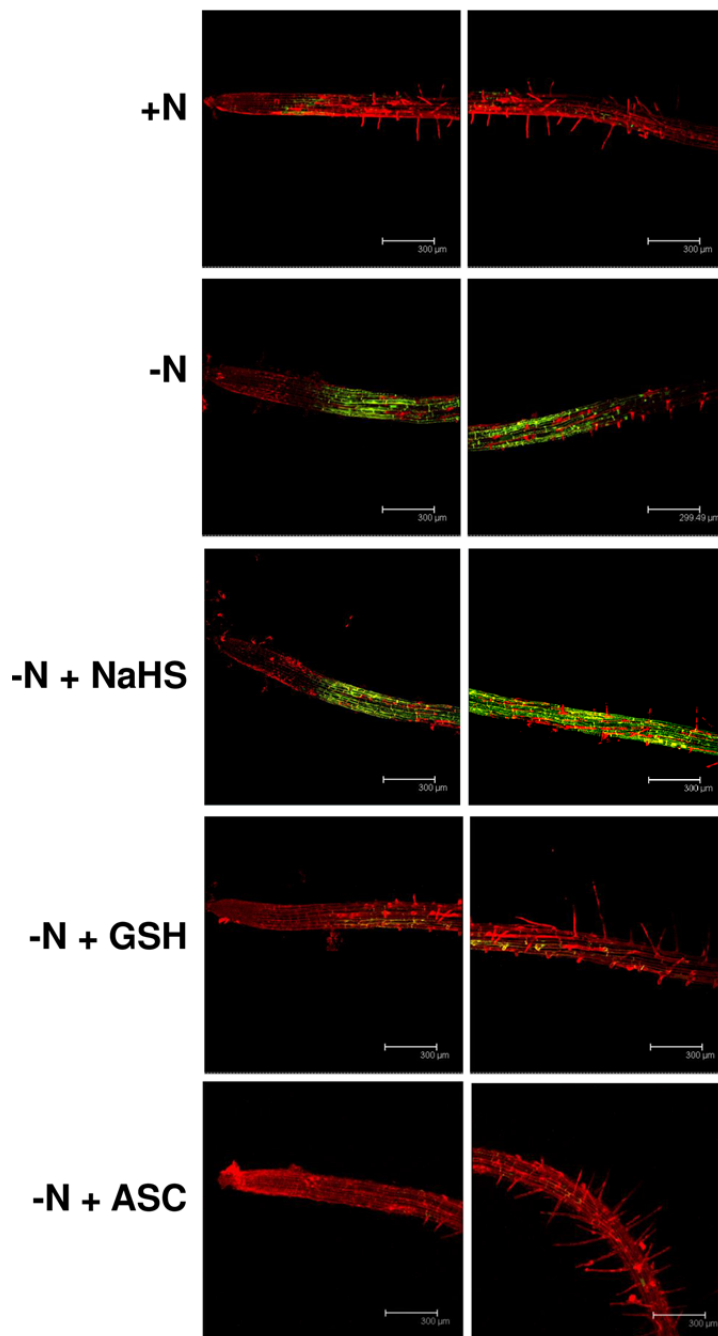


Figure 4. Detection of hydrogen peroxide in Arabidopsis roots. Wild type seedlings were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing either 200 μ M NaHS (-N + NaHS), GSH (-N + GSH) or ascorbate (-N + ASC) for an additional 4 days. The roots were loaded with H_2DCFDA for 5 min to detect H_2O_2 (pseudocolored in green) in the presence of PI to visualize cell walls (pseudocolored in red). Representative images of two different zones of the root for each sample are shown.

most intensively and extensively distributed in roots after 4 days of growth on nitrogen-deficient media alone and in the presence of sulfide by comparison with the other studied conditions, mainly in the root differentiation zone used for monitoring GFP-ATG8.

We further analyzed the effect of both GSH and ascorbate on the increased accumulation of autophagic bodies in response to nitrogen limitation in plants expressing the GFP-ATG8a fusion protein (Fig. 6). Only the presence of NaHS in the media significantly inhibited the accumulation of fluorescent vesicles, while GSH and ascorbate were unable to produce any effect (Fig. 6A). Representative single optical sections of the images visualized by confocal microscopy are shown in the Supplemental Material (Supplemental Fig. S3). Similar results were also obtained when the immunoblot analysis was performed. The presence of sulfide and no GSH and ascorbate significantly decreased the accumulation of the free GFP level, indicative of a repression of the autophagic flux by sulfide (Fig. 6B). These data clearly suggested that the effect of sulfide on the progression of autophagy is independent of ROS. In a previous work, however, a reduction of punctate structures was observed in the presence of antioxidants (Liu et al., 2009). Differences in methodological procedures, antioxidant concentrations and timing of the treatments make both investigations are not comparable. In the present work the antioxidant treatment is performed in solid medium at 200 μ M for 4 days in nitrogen-deficient conditions, which are exactly the same conditions used to check the effect of sulfide as a possible antioxidant. On the contrary, in the previous work (Liu et al., 2009) the treatment is performed in liquid nitrogen-rich medium with the antioxidant at 20 mM in one case (imidazole) and 2 mM in other case (ascorbate) for 4 h.

Correlation between Autophagy and DES1

Previously, we demonstrated that DES1 deficiency leads to the accumulation and lipidation of ATG8 proteins. Through genetic complementation or exogenous application of sulfide, we were able to rescue autophagy induction in *des1* null mutants (Alvarez et al., 2012). Consequently, we suggested that DES1 should modulate the generation of sulfide in the plant cytosol for autophagy signaling (Gotor et al., 2013; Romero et al., 2013). In addition, we wanted to determine whether stressful conditions that induce autophagy, such as nutrient limitation, had any effect on DES1. To test this hypothesis, we performed the same experiment as described above and compared seedlings grown under nitrogen-rich and nitrogen-deficient conditions in terms of *DES1* gene expression and DES enzyme activity (Fig. 7). A strong reduction (73 %) in *DES1* gene expression was observed in the roots of seedlings grown in nitrogen-deficient media compared with those grown in nitrogen-replete media. The

FIGURE 6

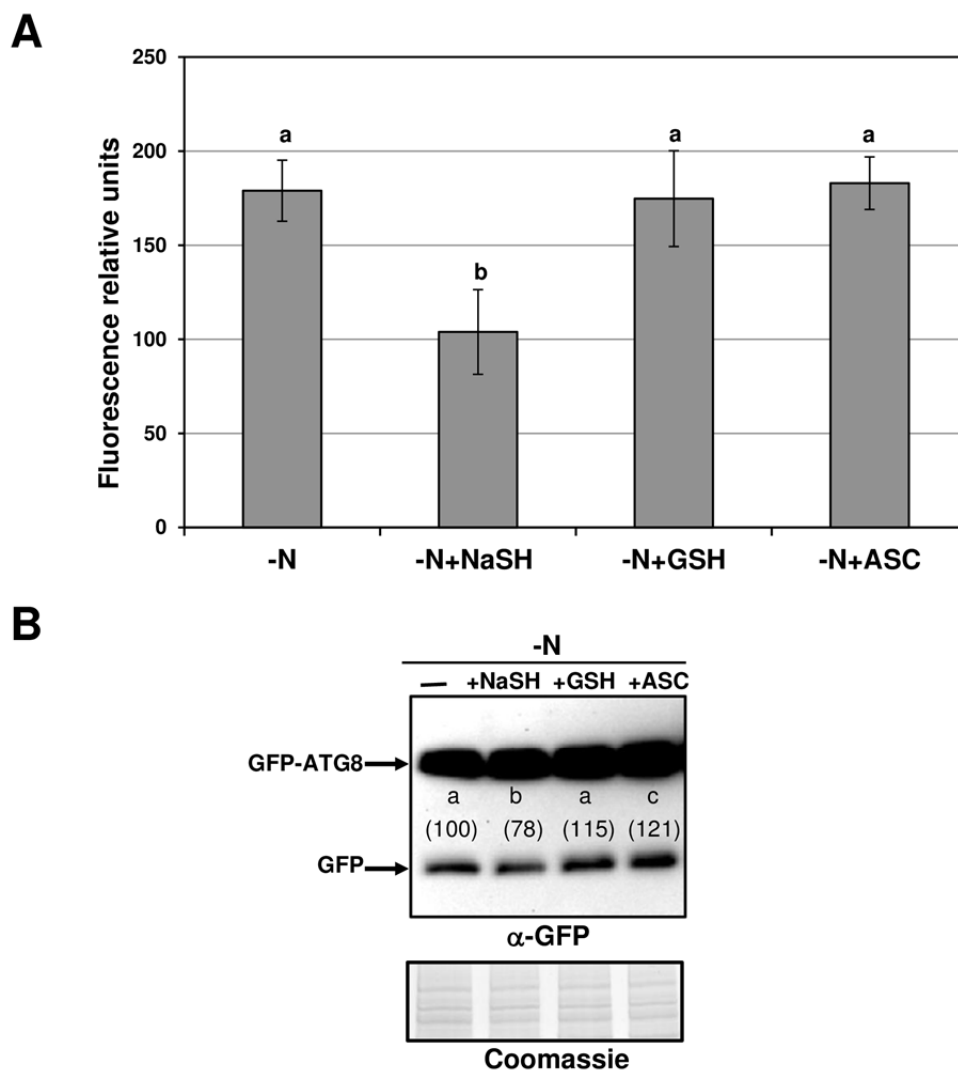


Figure 6. Effect of exogenous sulfide, reduced glutathione and ascorbate on the autophagy induced by nitrogen deprivation in *Arabidopsis* roots. Wild type seedlings expressing GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing either 200 μ M NaHS (-N + NaHS), GSH (-N + GSH), or ascorbate (-N + ASC) for an additional 4 days. (A) Root cells were visualized by confocal fluorescence microscopy and, prior to observation, were exposed to concanamycin A as described in the Materials and Methods. The mean fluorescence inside the vacuoles was determined using ImageJ software. Values are expressed as relative units (\pm SD) of mean fluorescence within the central vacuoles of the three independent experiments. Representative single optical section of fluorescence, visible and overlaid images are shown in Supplemental Figure S3. (B) Immunoblot analysis of GFP-ATG8a fusion protein. Total protein extracts were prepared from roots as described in the Materials and Methods, and 8 μ g of each extract was resolved by 10 % SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis with anti-GFP antibodies. As the protein loading control, a gel was run in parallel and stained with Coomassie Brilliant Blue. The experiment was repeated three times, and representative images are shown. The amount of the free GFP protein band relative to the loading control was quantified, and the average is shown in parentheses, with a value of 100 % assigned to the band corresponding to the -N sample. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

356 total DES activity was also slightly decreased when the seedlings were transferred to nitrogen-
 357 deprived conditions, but this reduction was not statistically significant. Other enzymes with
 358 H_2S -releasing activity, which is the method used to measure DES activity, are present in

FIGURE 7

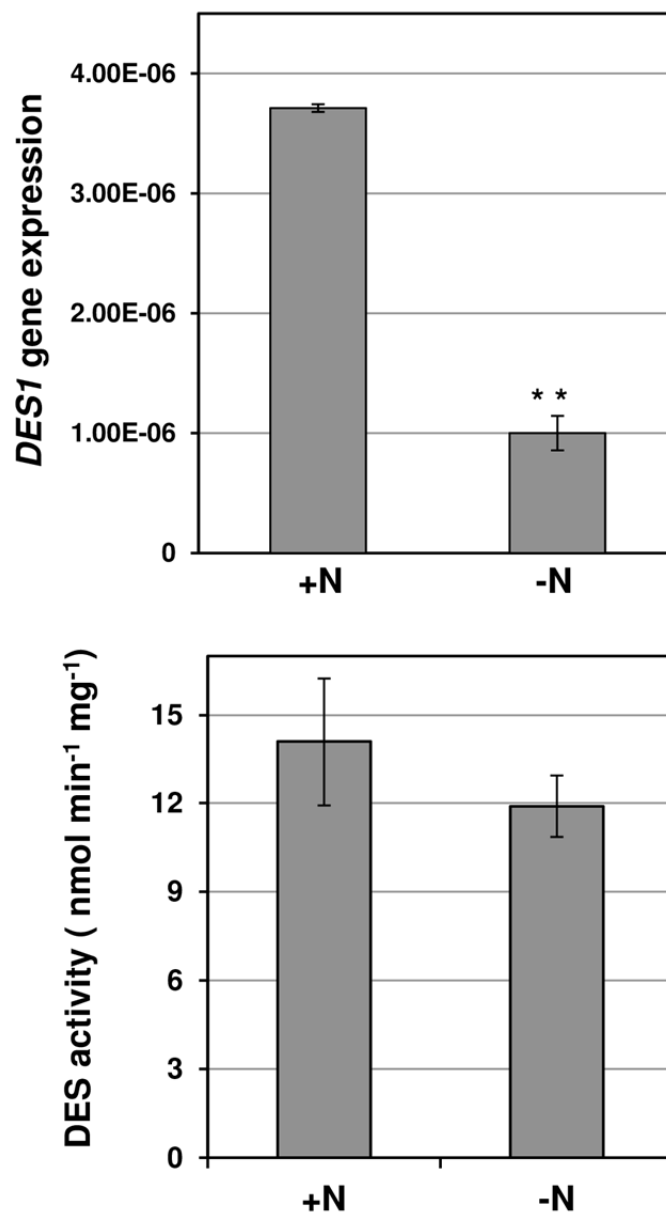


Figure 7. Effect of nitrogen starvation on *DES1* gene expression and DES activity in Arabidopsis roots. Wild type seedlings were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N) or to a N-deficient medium (-N) for an additional 4 days. Root samples were collected and used for quantitative real-time RT-PCR to analyze the expression of the *DES1* gene and to measure DES activity as described in the Materials and Methods. Values are the means \pm SD of three independent experiments. **P<0.01

plants; therefore, the contribution of cytosolic DES1 protein to total DES activity is expected to be low.

The Effect of Sulfide Is Observable at the Phenotypic Level

To establish that particular concentrations of sulfide molecule donors did not have a toxic effect on seedling growth, we studied the phenotypic characteristics of seedlings expressing GFP-ATG8a and grown in the different conditions described above. When the seedlings were transferred from N-rich to N-deficient media, a decrease in shoot and root biomass was evident at the beginning of the transfer period. After 4 days, a change in leaf color was appreciable in the nitrogen-deficient media and reflected the repression of chlorophyll synthesis and the induction of anthocyanin synthesis, which are characteristic plant responses to nitrogen deprivation (Scheible et al., 2004; Peng et al., 2007). In contrast, the presence of NaHS apparently reduced the extent of browning, which was primarily observable in the abaxial portion of the leaves, resulting in a healthier phenotype (Fig. 8A). The level of anthocyanin was approximately 6-fold higher in the nitrogen-starved seedlings than in the nitrogen-sufficient seedlings. The presence of NaHS resulted in identical (or even slightly lower) anthocyanin content compared to that in the nitrogen-sufficient seedlings (Fig. 8B). Furthermore, the presence of sulfide in the nitrogen-limited medium was effective in alleviating the stress induced by the absence of a nitrogen source during the longer treatment periods (6 and 8 days). During these long periods of nitrogen deprivation, the application of lower concentrations of sulfide and the use of NaHS as a sulfide donor were more effective for reducing stress (Supplemental Fig. S4, S5). Therefore, we can conclude that hydrogen sulfide can play important roles in plants, with phenotypically observable outcomes.

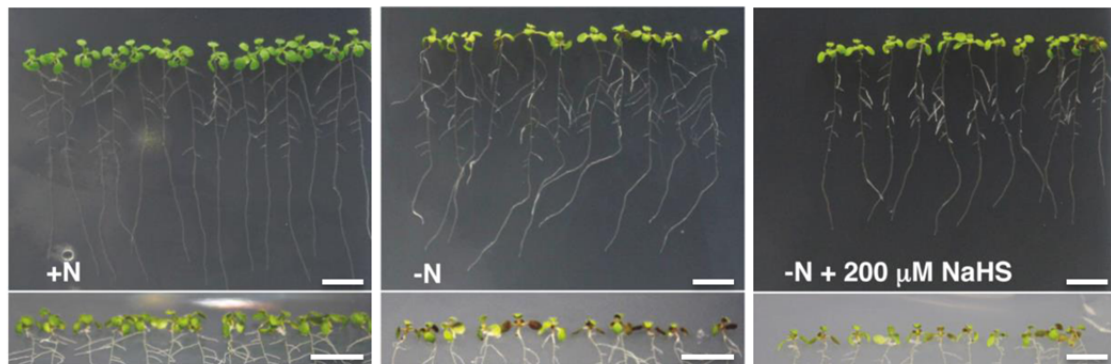
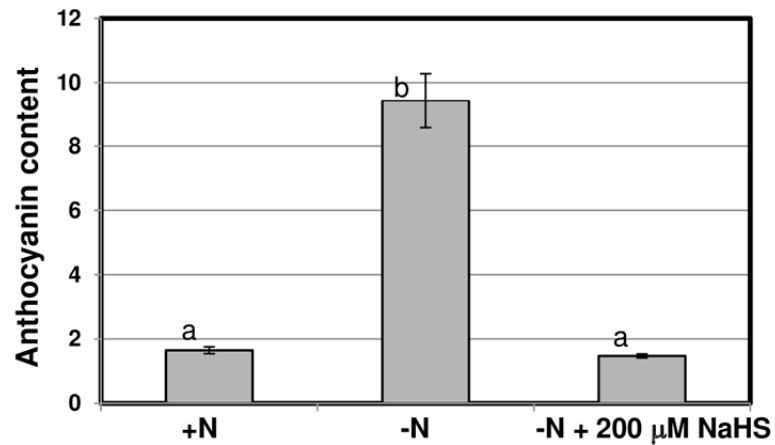
A**FIGURE 8****B**

Figure 8. Phenotypes of the wild type seedlings expressing GFP-ATG8a under different conditions. Wild type seedlings expressing the GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μ M NaHS for an additional 4 days. (A) Representative bright field images of whole seedlings are shown. The lower panels show images of the underside of the leaves (abaxial part of the leaves) Bars = 1 cm. (B) The anthocyanin content per gram fresh weight was measured as described in Materials and Methods. Values are the means \pm SD of three independent experiments. Different letters indicate significant differences ($P < 0.01$).

DISCUSSION

The conceptualization of the role of hydrogen sulfide in both animal and plant systems has changed dramatically in recent years. Currently, hydrogen sulfide is viewed not as a toxic molecule to life, but rather as a regulator of essential life processes. In mammals, hydrogen sulfide has been considered to be a gasotransmitter with major physiological functions in different body systems (Gadalla and Snyder, 2010). Alterations of H₂S metabolism have important pathological consequences, establishing the clinical relevance of this molecule (Lowicka and Beltowski, 2007; Szabo, 2007; Wang, 2012). In addition to the protective effects of hydrogen sulfide against a wide array of different stresses that have been demonstrated in plants (Zhang et al., 2008; Wang et al., 2010; Zhang et al., 2010; Jin et al., 2011; Dawood et al., 2012; Li et al., 2012; Li et al., 2012; Cheng et al., 2013; Christou et al., 2013; Sun et al., 2013), this molecule has also been shown to regulate plant processes that are critical for plant performance, such as photosynthesis (Chen et al., 2011), stomatal movement (Garcia-Mata and Lamattina, 2010; Lisjak et al., 2010; Scuffi et al., 2014) and autophagy (Alvarez et al., 2012; Gotor et al., 2013). In the present study, we provide new experimental evidence that, together with our previous findings, demonstrates the role of hydrogen sulfide in regulating the progression of autophagy independently of the condition in which the autophagy originates. Most importantly, our findings contribute to our understanding of the mechanism underlying the regulation of autophagy by sulfide in plant systems, by confirming that its role is not dependent on the redox state.

As in other organisms, autophagy is constitutively active in plant cells under favorable growth conditions (Slavikova et al., 2005). However, when plants are exposed to adverse environmental conditions, one of their responses to cope with stress and survive is to increase the induction of autophagy. These stresses include nitrogen and carbon deprivation. Several studies have reported that autophagy can be induced by carbon and nitrogen deprivation, which is detected in many cases through a substantial increase in ATG8 protein levels (Doelling et al., 2002; Hanaoka et al., 2002; Thompson et al., 2005; Xiong et al., 2005; Chung et al., 2009; Guiboileau et al., 2013). In the present study, we observed basal levels of autophagy under nitrogen-sufficient conditions. However, under stressful growth conditions, increased levels of autophagy were observed under nitrogen deprivation. Interestingly, the presence of sulfide during stress prevented an increase in the activation of autophagy,

revealing the same level of basal autophagy as observed in the favorable growth conditions. The observed effect of sulfide was unrelated to its availability as a nutrient, as the growth media contained sulfate salts as a source of sulfur nutrients. Furthermore, the presence of ammonium at the same concentration did not alter the activation of autophagy.

This study was performed in root cells from young seedlings overexpressing GFP-ATG8a under nitrogen deprivation using GFP fluorescence detection to monitor autophagy. Identical effects of sulfide on autophagy have been previously observed in different tissue (leaves), at different plant developmental stages (mature plants), under different stress conditions (carbon starvation) and in different genetic backgrounds (*des1* mutant) (Alvarez et al., 2012). Therefore, the evidence indicates that sulfide regulates the progression of autophagy by acting as a repressor in plant systems. In mammals, the effect of sulfide on autophagy is unclear because recent findings have indicated that sulfide can both suppress and induce autophagy (Wang et al., 2012; Kundu et al., 2014). Recently, the sulfur amino acids cysteine and methionine have been shown to regulate the translational capacity and metabolic homeostasis in eukaryotic cells and to inhibit autophagy and promote cell growth (Laxman et al., 2013; Sutter et al., 2013). In the latter report, the importance was placed on methionine as a precursor of the methyl donor S-adenosylmethionine, which has been reported to inhibit autophagy through the action of methyltransferase enzymes, although cysteine has also been shown to suppress autophagy.

Deciphering the mechanism underlying the transformation of the sulfide signal into a biological response and identifying the molecular targets of sulfide remain challenging. It has been previously shown that the hydrogen sulfide anion (HS^-) can generate cysteine and glutathione persulfides with antioxidant properties that are superior to GSH (Francoleon et al., 2011) (Ida et al., 2014). The persulfides have been shown to act as reactive reductants that are capable of reacting rapidly with the electrophilic H_2O_2 ; therefore, persulfides exhibit H_2O_2 -scavenging activity. Moreover, several studies in photosynthetic organisms have demonstrated the activation of autophagy in response to several conditions that increase ROS generation, suggesting the presence of a strong link between autophagy and ROS (Perez-Perez et al., 2012). Thus, we sought to determine whether the mechanism underlying the repression of autophagy by sulfide involves some ROS, such as H_2O_2 and superoxide radical, this latter with well-established functions in roots. Our results showed that sulfide was unable to scavenge the ROS generated by nitrogen limitation, as observed for reduced glutathione and ascorbate.

Moreover, upon nitrogen limitation, we clearly differentiated the inhibitory effect of sulfide both on the accumulation of autophagic bodies visualized by GFP fluorescence and on the accumulation of ATG8 protein forms detected by immunoblotting, from the effect produced by reduced glutathione and ascorbate, which were unable to reverse to any extent the progression of autophagy. Therefore, our results suggest that the effect of sulfide on the progress of autophagy is independent of its capacity to react with H_2O_2 or with superoxide radical anion.

The second mechanism proposed in animal systems to explain the physiological effects of H_2S is the post-translational modification of proteins known as S-sulphydration (Paul and Snyder, 2012). Previous studies have indicated that this modification can be regulated by competition between the nitrosylation and sulphydration of the same cysteine residues. S-sulphydration changes an $-\text{SH}$ to an $-\text{SSH}$, modifying the chemical reactivity of enzymes and possibly their access to their respective targets, as observed for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Gadalla and Snyder, 2010; Kabil and Banerjee, 2010; Paul and Snyder, 2012). Very recently, S-sulphydration of proteins has been confirmed to occur in Arabidopsis leaf tissues under physiological conditions, and the presence of an S-sulphydrated cysteine residue in a plant protein has recently been demonstrated for the first time (Aroca et al., 2015). Therefore, two questions arise: whether S-sulphydration regulates autophagy and what are the specific targets of sulfide. The thiol redox state can profoundly influence autophagy, especially during the initiation and completion of autophagosomes, due to the ability of several proteins that are involved in autophagy to sense alterations in the cellular redox state by means of reactive cysteine residues (Filomeni et al., 2010). Examples of this are the ubiquitin-like systems ATG7-ATG10 and ATG7-ATG3, the function of which relies on the cysteine-based transfer of ATG12 and ATG8, respectively, which are essential proteins for autophagosome membrane elongation (Filomeni et al., 2010). Moreover, redox regulation of cysteine protease ATG4 has been characterized in detail in mammalian systems, and a cysteine residue located near the catalytic site has been found to be critical for this regulation (Scherz-Shouval et al., 2007). The ATG4 protein cleaves ATG8 near the C terminus, downstream of a conserved Gly, allowing the conjugation to PE to proceed through the exposed Gly. ATG4 also plays a role in the de-conjugation of ATG8-PE to release ATG8 from the autophagosome membrane. Because of its role as both a conjugating and de-conjugating enzyme, the activity of ATG4 is expected to be tightly regulated. A detailed study of the

ATG8-processing activity by two ATG4 isoforms from Arabidopsis has recently been reported. This study demonstrated a dose-dependent inhibition of Arabidopsis ATG4 cysteine protease activity under oxidative stress that was restored by DTT, indicating that this plant protein is also under redox regulation similarly to the mammalian protein (Woo et al., 2014). In addition, a study of yeast ATG4 demonstrated that this protein is regulated by the oxidoreduction of a single disulfide bond and that involves thioredoxin (Perez-Perez et al., 2014). Thus, both ubiquitin-like system proteins and the ATG4 protein could be specific targets of sulfide, and further studies are currently being developed.

In the present work, we provide more data that, together with previous studies, highlight the role of DES1 protein in autophagy. Not only does the deficiency in DES1 promote the induction of autophagy (Alvarez et al., 2012), but a conditions that induces autophagy also promotes the repression of DES1. Further research will be required to determine whether this reverse correlation can be generalized to other situations in which autophagy is activated and to ascertain the underlying regulatory mechanisms. In addition, this study, as well as previous ones, demonstrates that hydrogen sulfide plays an important signaling role in plants. This effect is observable phenotypically and is measurable by anthocyanin content because the presence of sulfide alleviated nitrogen limitation stress. When hydrogen sulfide is present below a toxic threshold, it plays a general role in improving plant performance. This finding is corroborated by a recent report that found that exposing plants to extremely low concentrations of sulfide results in significant increases in biomass (Dooley et al., 2013).

MATERIALS AND METHODS

Plant Material, Growth Conditions and Treatments

The *Arabidopsis thaliana* wild type plants expressing GFP-ATG8a used in this work have been described previously (Thompson et al., 2005), and the *atg7-1* mutant was obtained from NASC. *A. thaliana* seeds were sown on MS solid medium containing 0.8 % agar (w/v) and synchronized at 4 °C for 2 days. The plates were then incubated vertically in a growth chamber under a regime of 16 h light at 22 °C / 8 h dark at 20 °C. For exposure to N-starvation conditions, N-deficient MS media were prepared by replacing the nitrate salts with chlorate salts, without altering the sulfate salts. One-week-old seedlings were transferred to N-deficient MS solid media for an additional 2 or 4 days of growth. Alternatively, the 1-week-old seedlings were transferred to the same N-deficient MS media containing 200 or 100 µM of either Na₂S or NaHS as sources of exogenous sulfide. For the concanamycin A treatment, the seedlings were incubated in liquid N-deficient MS medium containing 0.5 µM concanamycin A (Santa Cruz Biotechnology) for 16 h at room temperature under agitation at 80 rpm. After the treatment, the roots were washed in water and the differentiation zone was observed under a confocal microscope. Concanamycin A was prepared as a 100 µM stock solution in dimethyl sulfoxide. To ensure that dimethyl sulfoxide did not produce any effect on the results of the experiments, the seedlings were also incubated in liquid N-deficient MS medium in the presence of dimethyl sulfoxide alone as a control.

Visualization and Quantification of GFP-Tagged Autophagic Bodies

Root cells were viewed using a TCS SP2 spectral confocal microscope (Leica Microsystems). GFP was excited using the 488 nm line of an argon ion laser, and emission was detected between 510 and 580 nm. Single optical images were processed with PDQuest software (Bio-Rad) as follows. First, a black and white image was automatically generated from the original image and a minimal intensity and size of the spot were defined. Second, a new image was generated with the selected spots encircled in red, a manual correction was performed to adjust the selected spots to the cells to be counted, and a file with automatic counting was obtained (Supplemental Fig. S6). The number of fluorescent vesicles within the

central vacuoles was counted in 25 to 35 different cells. The data represent the average number (\pm SD) from three independent experiments. Images were also processed using ImageJ software. In the latter, the mean fluorescence within the vacuoles was counted within a 400- μm^2 section from the same cells. The results, when expressed as a percentage relative to the value obtained in the N-rich medium, were the same using both software programs.

Immunoblot Analysis

Plant root material (20-100 mg) was ground in liquid nitrogen with 100-400 μL of extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 400 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mg mL^{-1} sodium deoxycholate, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg mL^{-1} pepstatin A and 4 % [v/v] protease inhibitor cocktail [Roche]) using a pestle and mortar and centrifuged at 500 g for 10 min to obtain the supernatant fraction as described previously (Yoshimoto et al., 2004; Alvarez et al., 2012). The total amount of protein in the resulting supernatant was determined using a previously described method (Bradford, 1976). For subcellular fractionation, the supernatant was centrifuged at 13,000 g for 15 min to generate the membrane fraction and the supernatant (Yoshimoto et al., 2004). For the immunoblot analyses, 3 μg of root protein extracts was electrophoresed in 10 % acrylamide gels or, alternatively, 20 μg of root protein extracts were electrophoresed in 15 % acrylamide gels before transfer to polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Anti-Cr-ATG8 (Perez-Perez et al., 2010; Alvarez et al., 2012), anti-GFP (eBioscience) and secondary antibodies were diluted 1:2,000, 1:1,000 and 1:50,000, respectively, in PBS containing 0.1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) and 5 % milk powder. The ECL Select Western Blotting Detection Reaction (GE Healthcare) was used to detect the proteins with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibodies. For a protein loading control, an identical gel was run in parallel and stained with Coomassie Brilliant Blue (Sigma) or, alternatively, the membrane before immunodetection was stained with SYPRO Ruby (Life Technologies) to detect all protein bands. The immunodetected protein bands were quantified relative to the Coomassie-stained gel or SYPRO-stained membrane using the Quantity One software (Bio-Rad).

Detection of ROS

For the fluorimetric detection of H_2O_2 , roots were incubated for 5 min with 10 mM H_2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Life Technologies) in the presence of 10 mM PI (propidium iodide, Life Technologies) to visualize the cell walls. The samples were observed using a TCS SP2 spectral confocal microscope (Leica Microsystems) with the following settings: excitation, 488 nm; emission, 500 to 550 nm for fluorescein detection and 600 to 650 nm for propidium detection. For the detection of the superoxide radical anion, roots were stained with NBT (nitroblue tetrazolium chloride, Sigma-Aldrich) as previously described (Garcia et al., 2010). The seedlings were incubated in 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.05 M $MgCl_2$ and 0.5 mg mL⁻¹ NBT (pH 9.5) for 2 h at room temperature in the dark. After rinsing the roots were observed with an Olympus SZ-PT stereoscope equipped with a DFC300FX Leica camera.

Real-Time RT-PCR

Quantitative real-time RT-PCR was used to analyze the expression of the *DES1* gene as described previously (Laureano-Marin et al., 2014). The primer sequences used were as follows: qDES1-F, 5'-TCGAGTCAGTCAGATATGAAGCT-3' and qDES1-R, 5'-TGTAACCTTGGTACCAACA TCTCT-3' for the *DES1* gene; qUBQ-F, 5'-GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG-3' and qUBQ-R, 5'-AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT-3' for the constitutive *UBQ10* gene. The *DES1* expression levels were normalized to that of the constitutive *UBQ10* gene by subtracting the cycle threshold (CT) value of *UBQ10* from the CT value of the *DES1* gene (ΔCT). The results shown are the means \pm SD of at least three independent RNA samples.

Determination of DES Activity

Plant root material was ground in 20 mM Tris-HCl (pH 8) using a mortar and pestle with liquid nitrogen. After centrifugation at 15,000 g for 15 min at 4 °C, the resulting supernatant was used as a plant soluble extract for DES activity. The total amount of protein in the extracts was determined by the Bradford method using the Bio-Rad protein assay. DES activity was measured by the release of sulfide from L-Cys as described previously (Alvarez et al., 2010).

Determination of Anthocyanin Content

Approximately 40-70 mg of aerial tissues from seedlings was homogenized in 1 mL of propanol:HCl:water (18:1:81) and further extracted in a boiling water bath for 3 min. The mixture was centrifuged at 5,000 g for 40 min. The absorbance of the supernatant was measured at 535 and 650 nm, and the total anthocyanin content per gram fresh weight was determined using previously described methods (Lange et al., 1971).

Statistical Analysis

Multivariate analysis of variance (ANOVA) statistical analysis of the data was performed using the program Statgraphics Centurion.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Irene García for critical reading of the manuscript, Dr. Alicia Orea for confocal microscopy service, Dr. José Luis Crespo for providing the anti-ATG8 antibodies, and Dr. Richard Vierstra for providing seeds of wild type *A. thaliana* expressing GFP-ATG8a.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of exogenous sulfide on autophagy induced by nitrogen deprivation in Arabidopsis roots. Wild type seedlings expressing GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μ M NaHS (-N + NaHS) for an additional 2 days (A) or 4 days (B). The root cells were visualized by confocal fluorescence microscopy and exposed to concanamycin A prior to observation as described in the Materials and Methods. Representative single optical section of fluorescence, visible and overlaid images are shown. The number of GFP-ATG8 puncta per cell section was determined using PDQuest software as described in the Materials and Methods. Values are the average number (\pm SD) of fluorescent vesicles within the central vacuoles per cell of 25-35 cells in each of the three independent experiments. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Figure 2. Effect of different chemicals (A) and concentrations (B) on the autophagy induced by nitrogen starvation in Arabidopsis roots. Wild type seedlings expressing GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred for an additional 4 days to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μ M of different salts as indicated in panel (A); or alternatively to the N-deficient medium containing different concentrations of NaHS as indicated in panel (B). Root cells were visualized by confocal fluorescence microscopy and, prior to observation, were exposed to concanamycin A as described in the Materials and Methods. The number of autophagic bodies per cell section was determined using the PDQuest software as described in the Materials and Methods. Values are the average number (\pm SD) of fluorescent vesicles within the central vacuoles per cell of 25-35 cells in each of the three independent experiments. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Figure 3. Immunoblot analysis of GFP-ATG8a fusion and endogenous ATG8 protein accumulation in Arabidopsis roots. (A) Wild type and wild type seedlings expressing the GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μ M NaHS (-N + S) for an additional 4 days. Total protein extracts were prepared from roots as

described in the Materials and Methods, and 3 μ g of each extract was resolved by 10 % SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis with anti-GFP antibodies (left panel); and 20 μ g of each extract was resolved by 15 % SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis with anti-ATG8 (right panel). As the protein loading control, before immunodetection, the membrane was stained with SYPRO Ruby. The experiment was repeated three times and representative images are shown. The amount of each immunodetected protein band relative to the loading control was quantified in the three replicates of the experiment, and the average is shown in parentheses, with a value of 100 % assigned to the band corresponding to the +N sample. (B) Wild type and *atg7-1* mutant seedlings were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μ M NaHS (-N + S) for an additional 4 days. Total protein extracts were prepared from roots and membrane and soluble fractions were separated by centrifugation as described in the Materials and Methods, and 15 μ L of each fraction was resolved by 15 % SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis with anti-ATG8. As the protein loading control, a gel was run in parallel and stained with Coomassie Brilliant Blue. In the membrane fraction, the amount of the lipidated ATG8 protein band (shown with an asterisk) was quantified relative to the loading control, with a value of 100 % assigned to the band corresponding to the -N sample of the wild type. In the soluble fraction, all together immunodetected protein bands were quantified relative to the loading control, with a value of 100 % assigned to the band corresponding to the -N sample of the wild type. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Figure 4. Detection of hydrogen peroxide in Arabidopsis roots. Wild type seedlings were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing either 200 μ M NaHS (-N + NaHS), or GSH (-N + GSH), or ascorbate (-N + ASC) for an additional 4 days. The roots were loaded with H₂DCFDA for 5 min to detect H₂O₂ (pseudocolored in green) in the presence of PI to visualize cell walls (pseudocolored in red). Representative images of two different zones of the root for each sample are shown.

Figure 5. Detection of superoxide in Arabidopsis roots. Wild type seedlings were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient

medium (-N), or to a N-deficient medium containing either 200 μ M NaHS (-N + NaHS), or GSH (-N + GSH), or ascorbate (-N + ASC) for an additional 4 days. The roots were stained with NBT as described in Materials and Methods. Representative images are shown. Bars = 250 μ m.

Figure 6. Effect of exogenous sulfide, reduced glutathione and ascorbate on the autophagy induced by nitrogen deprivation in Arabidopsis roots. Wild type seedlings expressing GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing either 200 μ M NaHS (-N + NaHS), GSH (-N + GSH), or ascorbate (-N + ASC) for an additional 4 days. (A) Root cells were visualized by confocal fluorescence microscopy and, prior to observation, were exposed to concanamycin A as described in the Materials and Methods. The mean fluorescence inside the vacuoles was determined using ImageJ software. Values are expressed as relative units (\pm SD) of mean fluorescence within the central vacuoles of the three independent experiments. Representative single optical section of fluorescence, visible and overlaid images are shown in Supplemental Figure S3. (B) Immunoblot analysis of GFP-ATG8a fusion protein. Total protein extracts were prepared from roots as described in the Materials and Methods, and 8 μ g of each extract was resolved by 10 % SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis with anti-GFP antibodies. As the protein loading control, a gel was run in parallel and stained with Coomassie Brilliant Blue. The experiment was repeated three times, and representative images are shown. The amount of the free GFP protein band relative to the loading control was quantified, and the average is shown in parentheses, with a value of 100 % assigned to the band corresponding to the -N sample. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Figure 7. Effect of nitrogen starvation on *DESI* gene expression and DES activity in Arabidopsis roots. Wild type seedlings were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N) or to a N-deficient medium (-N) for an additional 4 days. Root samples were collected and used for quantitative real-time RT-PCR to analyze the expression of the *DESI* gene and to measure DES activity as described in the Materials and Methods. Values are the means \pm SD of three independent experiments. ** $P < 0.01$.

Figure 8. Phenotypes of wild type seedlings expressing GFP-ATG8a under different conditions. Wild type seedlings expressing the GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μ M NaHS for an additional 4 days. (A) Representative bright field images of whole seedlings are shown. The lower panels show images of the underside of the leaves (abaxial part of the leaves). Bars = 1 cm. (B) The anthocyanin content per gram fresh weight was measured as described in Materials and Methods. Values are the means \pm SD of three independent experiments. Different letters indicate significant differences ($P < 0.01$).

Supplemental Data

Supplemental Figure S1. Autophagy induced by nitrogen deprivation in Arabidopsis roots. Wild type seedlings expressing the GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N) or to a N-deficient medium (-N) for 4 additional days. The root cells were visualized by confocal fluorescence microscopy. Representative single optical section images of fluorescence, visible and overlaid images are shown.

Supplemental Figure S2. Representative SDS-PAGE of protein extracts. Wild type seedlings expressing the GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 μ M NaHS for 4 additional days. Root (20 mg) and leaf (100 mg) plant materials were ground separately in liquid nitrogen with 100 and 300 μ L of extraction buffer, respectively, as described in Materials and Methods, and 10 μ L of the final supernatant fractions were electrophoresed in 10 % acrylamide gels and stained with Coomassie Brilliant Blue.

Supplemental Figure S3. Representative single optical section of fluorescence, visible and overlaid images visualized by confocal microscopy of the root cells corresponding to the experiment described in Figure 5.

Supplemental Figure S4. Phenotypes of wild type seedlings expressing GFP-ATG8a under different conditions. Representative bright field images of 7-day-old wild-type seedlings grown on N-rich medium and then transferred to a N-deficient medium (-N) or to a N-deficient medium containing NaHS or Na₂S at 100 or 200 μ M for 6 additional days. The lower panels show images of the abaxial part of the leaves. Bars = 1 cm.

Supplemental Figure S5. Phenotypes of wild type seedlings expressing GFP-ATG8a under different conditions. Representative bright field images of 7-day-old wild-type seedlings grown on N-rich medium and then transferred to a N-deficient medium (-N) or to a N-

deficient medium containing NaHS or Na₂S at 100 or 200 µM for 8 additional days. The lower panels show images of the abaxial part of the leaves. Bars = 1 cm.

Supplemental Figure S6. Image processing with PDQuest software (Bio-Rad). Two representative fluorescence confocal images were subjected to PDQuest software. The black and white images were automatically generated, and the images with selected spots are shown.

Supplemental Table S1. Protein concentration of root extracts. Wild type seedlings expressing the GFP-ATG8a fusion were grown for 7 days on N-rich medium and then transferred to the same medium (+N), to a N-deficient medium (-N), or to a N-deficient medium containing 200 µM NaHS for 4 additional days. 20 mg of plant root materials were ground in liquid nitrogen with 100 µL of extraction buffer as described in Materials and Methods. The total amount of protein in the resulting supernatant was determined using a previously described method (Bradford, 1976). Individual experiments and the average data together with the percentages relatives to the +N sample protein concentration in parentheses are shown.

779

780

Parsed Citations

Alvarez C, Bermudez MA, Romero LC, Gotor C, Garcia I (2012) Cysteine homeostasis plays an essential role in plant immunity. New Phytol 193: 165-177

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Alvarez C, Calo L, Romero LC, Garcia I, Gotor C (2010) An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in Arabidopsis. Plant Physiol 152: 656-669

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Alvarez C, Garcia I, Moreno I, Perez-Perez ME, Crespo JL, Romero LC, Gotor C (2012) Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in Arabidopsis. Plant Cell 24: 4621-4634

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Aroca A, Serna A, Gotor C, Romero LC (2015) S-sulphydration: a cysteine posttranslational modification in plant systems. Plant Physiol 168: 334-342

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Aroca A, Serna A, Gotor C, Romero LC (2015) S-sulphydration: a new post-translational modification in plant systems. Plant Physiol

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bassham DC (2007) Plant autophagy--more than a starvation response. Curr Opin Plant Biol 10: 587-593

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bassham DC (2014) Methods for analysis of autophagy in plants. Methods

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. Autophagy 2: 2-11

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Chen J, Wu FH, Wang WH, Zheng CJ, Lin GH, Dong XJ, He JX, Pei ZM, Zheng HL (2011) Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in Spinacia oleracea seedlings. J Exp Bot 62: 4481-4493

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Cheng W, Zhang L, Jiao C, Su M, Yang T, Zhou L, Peng R, Wang R, Wang C (2013) Hydrogen sulfide alleviates hypoxia-induced root tip death in Pisum sativum. Plant Physiol Biochem 70: 278-286

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Christou A, Manganaris GA, Papadopoulos I, Fotopoulos V (2013) Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. J Exp Bot 64: 1953-1966

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Chung T, Phillips AR, Vierstra RD (2010) ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in Arabidopsis require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A AND ATG12B loci. Plant J 62: 483-493

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Chung T, Suttangkakul A, Vierstra RD (2009) The ATG autophagic conjugation system in maize: ATG transcripts and abundance of

the ATG8-lipid adduct are regulated by development and nutrient availability. *Plant Physiol* 149: 220-234

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Contento AL, Xiong Y, Bassham DC (2005) Visualization of autophagy in Arabidopsis using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J* 42: 598-608

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Dawood M, Cao F, Jahangir MM, Zhang G, Wu F (2012) Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley. *J Hazard Mater* 209-210: 121-128

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD (2002) The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* 277: 33105-33114

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Dooley FD, Nair SP, Ward PD (2013) Increased growth and germination success in plants following hydrogen sulfide administration. *PLoS One* 8: e62048

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Filomeni G, Desideri E, Cardaci S, Rotilio G, Ciriolo MR (2010) Under the ROS...thiol network is the principal suspect for autophagy commitment. *Autophagy* 6: 999-1005

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* 155: 2-18

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Francoleon NE, Carrington SJ, Fukuto JM (2011) The reaction of H₂S with oxidized thiols: generation of persulfides and implications to H₂S biology. *Arch Biochem Biophys* 516: 146-153

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Fukuto JM, Carrington SJ, Tantillo DJ, Harrison JG, Ignarro LJ, Freeman BA, Chen A, Wink DA (2012) Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species. *Chem Res Toxicol* 25: 769-793

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Gadalla MM, Snyder SH (2010) Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J Neurochem* 113: 14-26

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Garcia I, Castellano JM, Vioque B, Solano R, Gotor C, Romero LC (2010) Mitochondrial {beta}-Cyanoalanine Synthase Is Essential for Root Hair Formation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 22: 3268-3279

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Garcia-Mata C, Lamattina L (2010) Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytol* 188: 977-984

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Garcia-Mata C, Lamattina L (2013) Gasotransmitters are emerging as new guard cell signaling molecules and regulators of leaf gas exchange. *Plant Sci* 201-202: 66-73

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Gotor C, Garcia I, Crespo JL, Romero LC (2013) Sulfide as a signaling molecule in autophagy. Autophagy 9: 609-611

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Gotor C, Laureano-Marin AM, Moreno I, Aroca A, Garcia I, Romero LC (2014) Signaling in the plant cytosol: cysteine or sulfide? Amino Acids

Guiboileau A, Avila-Ospina L, Yoshimoto K, Soulay F, Azzopardi M, Marmagne A, Lothier J, Masclaux-Daubresse C (2013) Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in Arabidopsis leaves depending on nitrate availability. New Phytol 199: 683-694

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Ohsumi Y (2002) Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. Plant Physiol 129: 1181-1193

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Hancock JT, Whiteman M (2014) Hydrogen sulfide and cell signaling: team player or referee? Plant Physiol Biochem 78: 37-42

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Hu LY, Hu SL, Wu J, Li YH, Zheng JL, Wei ZJ, Liu J, Wang HL, Liu YS, Zhang H (2012) Hydrogen sulfide prolongs postharvest shelf life of strawberry and plays an antioxidative role in fruits. J Agric Food Chem 60: 8684-8693

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 7606-7611

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Jin Z, Shen J, Qiao Z, Yang G, Wang R, Pei Y (2011) Hydrogen sulfide improves drought resistance in Arabidopsis thaliana. Biochem Biophys Res Commun 414: 481-486

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Kabil O, Banerjee R (2010) Redox biochemistry of hydrogen sulfide. J Biol Chem 285: 21903-21907

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Kimura H (2011) Hydrogen sulfide: its production and functions. Exp Physiol 96: 833-835

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Kundu S, Pushpakumar S, Khundmiri SJ, Sen U (2014) Hydrogen sulfide mitigates hyperglycemic remodeling via liver kinase B1-adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling. Biochim Biophys Acta 1843: 2816-2826

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Lange H, Shropshire W, Mohr H (1971) An Analysis of Phytochrome-mediated Anthocyanin Synthesis. Plant Physiol 47: 649-655

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Laureano-Marin AM, Garcia I, Romero LC, Gotor C (2014) Assessing the transcriptional regulation of L-cysteine desulfhydrase 1 in Arabidopsis thaliana. Front Plant Sci 5: 683

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Laxman S, Sutter BM, Wu X, Kumar S, Guo X, Trudgian DC, Mirzaei H, Tu BP (2013) Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation. Cell 154: 416-429

Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Li F, Chung T, Vierstra RD (2014) AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in Arabidopsis. Plant Cell 26: 788-807

- Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Li F, Vierstra RD (2012) Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. Trends Plant Sci 17: 526-537**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Li L, Moore PK (2008) Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? Trends Pharmacol Sci 29: 84-90**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Li L, Wang Y, Shen W (2012) Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. Biometals 25: 617-631**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Li ZG, Gong M, Xie H, Yang L, Li J (2012) Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (Nicotiana tabacum L) suspension cultured cells and involvement of Ca(2+) and calmodulin. Plant Sci 185-186: 185-189**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Li ZG, Yang SZ, Long WB, Yang GX, Shen ZZ (2013) Hydrogen sulphide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (Zea mays L.) seedlings. Plant Cell Environ 36: 1564-1572**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Lisjak M, Srivastava N, Teklic T, Civalo L, Lewandowski K, Wilson I, Wood ME, Whiteman M, Hancock JT (2010) A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. Plant Physiol Biochem 48: 931-935**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Lisjak M, Teklic T, Wilson ID, Whiteman M, Hancock JT (2013) Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule? Plant Cell Environ 36: 1607-1616**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Liu Y, Xiong Y, Bassham DC (2009) Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. Autophagy 5: 954-963**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Lowicka E, Beltowski J (2007) Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. Pharmacol Rep 59: 4-24**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Merkulova EA, Guiboileau A, Naya L, Masclaux-Daubresse C, Yoshimoto K (2014) Assessment and optimization of autophagy monitoring methods in Arabidopsis roots indicate direct fusion of autophagosomes with vacuoles. Plant Cell Physiol 55: 715-726**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Moriyasu Y, Ohsumi Y (1996) Autophagy in Tobacco Suspension-Cultured Cells in Response to Sucrose Starvation. Plant Physiol 111: 1233-1241**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH (2009) H₂S signals through protein S-sulfhydration. Sci Signal 2: ra72**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Paul BD, Snyder SH (2012) H(2)S signalling through protein sulfhydration and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol 13: 499-507**
Pubmed: [Author and Title](#)
CrossRef: [Author and Title](#)
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Peng M, Bi YM, Zhu T, Rothstein SJ (2007) Genome-wide analysis of Arabidopsis responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA. Plant Mol Biol 65: 775-797**
Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Perez-Martin M, Perez-Perez ME, Lemaire SD, Crespo JL (2014) Oxidative stress contributes to autophagy induction in response to endoplasmic reticulum stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol 166: 997-1008

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Perez-Perez ME, Couso I, Crespo JL (2012) Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Autophagy 8: 376-388

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL (2010) Inhibition of Target of Rapamycin Signaling and Stress Activate Autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol 152: 1874-1888

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Perez-Perez ME, Lemaire SD, Crespo JL (2012) Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. Plant Physiol 160: 156-164

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Perez-Perez ME, Zaffagnini M, Marchand CH, Crespo JL, Lemaire SD (2014) The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. Autophagy 10: 1953-1964

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Phillips AR, Suttangkakul A, Vierstra RD (2008) The ATG12-conjugating enzyme ATG10 Is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 178: 1339-1353

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Romero LC, Garcia I, Gotor C (2013) L-Cysteine Desulphydrase 1 modulates the generation of the signaling molecule sulfide in plant cytosol. Plant Signal Behav 8: e24007

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Scheible WR, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. Plant Physiol 136: 2483-2499

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. Embo J 26: 1749-1760

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Scuffi D, Alvarez C, Laspina N, Gotor C, Lamattina L, Garcia-Mata C (2014) Hydrogen sulfide generated by L-cysteine desulphydrase acts upstream of nitric oxide to modulate abscisic acid-dependent stomatal closure. Plant Physiol 166: 2065-2076

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Shin KD, Lee HN, Chung T (2014) A revised assay for monitoring autophagic flux in *Arabidopsis thaliana* reveals involvement of AUTOPHAGY-RELATED9 in autophagy. Mol Cells 37: 399-405

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Slavikova S, Shy G, Yao Y, Glozman R, Levanony H, Pietrokovski S, Elazar Z, Galili G (2005) The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis* plants. J Exp Bot 56: 2839-2849

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Sun J, Wang R, Zhang X, Yu Y, Zhao R, Li Z, Chen S (2013) Hydrogen sulfide alleviates cadmium toxicity through regulations of cadmium transport across the plasma and vacuolar membranes in *Populus euphratica* cells. Plant Physiol Biochem 65: 67-74

Pubmed: [Author and Title](#)

Suttangkakul A, Li F, Chung T, Vierstra RD (2011) The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in Arabidopsis. Plant Cell 23: 3761-3779

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Sutter BM, Wu X, Laxman S, Tu BP (2013) Methionine inhibits autophagy and promotes growth by inducing the SAM-responsive methylation of PP2A. Cell 154: 403-415

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Szabo C (2007) Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov 6: 917-935

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Takatsuka C, Inoue Y, Matsuoka K, Moriyasu Y (2004) 3-methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. Plant Cell Physiol 45: 265-274

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD (2005) Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. Plant Physiol 138: 2097-2110

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Thompson AR, Vierstra RD (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. Curr Opin Plant Biol 8: 165-173

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Wang BL, Shi L, Li YX, Zhang WH (2010) Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (Cucumis sativus L.) seedlings. Planta 231: 1301-1309

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Wang D, Ma Y, Li Z, Kang K, Sun X, Pan S, Wang J, Pan H, Liu L, Liang D, Jiang H (2012) The role of AKT1 and autophagy in the protective effect of hydrogen sulphide against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. Autophagy 8: 954-962

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Wang R (2012) Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiol Rev 92: 791-896

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Wang Y, Li L, Cui W, Xu S, Shen W, Wang R (2012) Hydrogen sulfide enhances alfalfa (Medicago sativa) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. Plant and Soil 351: 107-119

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Woo J, Park E, Dinesh-Kumar SP (2014) Differential processing of Arabidopsis ubiquitin-like Atg8 autophagy proteins by Atg4 cysteine proteases. Proceedings of the National Academy of Sciences 111: 863-868

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Xiong Y, Contento AL, Bassham DC (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in Arabidopsis thaliana. Plant J 42: 535-546

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC (2007) Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in Arabidopsis. Plant Physiol 143: 291-299

Pubmed: [Author and Title](#)

CrossRef: [Author and Title](#)

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Yoshimoto K (2012) Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. Plant Cell Physiol 53: 1355-1365

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T, Ohsumi Y (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. Plant Cell 16: 2967-2983

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Yoshimoto K, Takano Y, Sakai Y (2010) Autophagy in plants and phytopathogens. FEBS Lett 584: 1350-1358

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Zhang H, Hu LY, Hu KD, He YD, Wang SH, Luo JP (2008) Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. J Integr Plant Biol 50: 1518-1529

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Zhang H, Hu S-L, Zhang Z-J, Hu L-Y, Jiang C-X, Wei Z-J, Liu J, Wang H-L, Jiang S-T (2011) Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. Postharvest Biology and Technology 60: 251-257

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Zhang H, Tan ZQ, Hu LY, Wang SH, Luo JP, Jones RL (2010) Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. J Integr Plant Biol 52: 556-567

Pubmed: [Author and Title](#)
 CrossRef: [Author and Title](#)
 Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Anexo

La S-sulphhidratación de ATG4a regula la autofagia en
Arabidopsis thaliana

S-sulphydration of ATG4a regulates autophagy in *Arabidopsis thaliana*

INTRODUCTION

Macroautophagy (hereafter autophagy) is the delivery of cytosolic cargos entrapped by double-membrane bound vesicles called autophagosomes to lytic compartment(s) for bulk degradation. Although autophagosomes are present at low levels at all times, autophagosome formation is stimulated, among other instances, in the acute response to nutrient starvation to allow the redistribution of cellular resources (Li and Vierstra, 2012). In yeasts, more than 40 *Autophagy-related* (*ATG*) genes that participate in this recycling pathway have been identified to date (Klionsky, 2007). Homologues of the yeast *ATG* genes have been identified in mammals and plants, which indicates the conservation of the core ATG mechanism during evolution. The *ATG* genes encode proteins required for phagophore initiation, enclosure of the autophagosome, and the fusion of the autophagosome with the vacuole. These ATG proteins include a group of proteins involved in the essential modification of ATG8 and ATG12, that are similar to the ubiquitin-like proteins (Downes and Vierstra, 2005). ATG8 is conjugated to phosphatidylethanolamine (PE) by E1 (ubiquitin-activating enzyme)-like ATG7, E2 (ubiquitin-conjugating enzyme)-like ATG3, and E3-like ATG12-ATG5-ATG16 complex. The ATG4 protease is required to remove extra C-terminal residues of ATG8 precursors and thereby expose a conserved glycine residue for conjugation. ATG8-PE is then targeted to the phagophore and is required for the expansion and closure of the autophagic vesicle to form the autophagosome. When overexpression of an *atg4* dominant-negative mutant was used to block the lipidation of ATG8 in mammals, it resulted in the accumulation of isolated unclosed membranes with abnormal morphologies (Fujita et al., 2008). In addition to processing the C-terminus of ATG8, ATG4 also functions as a deconjugating enzyme that cleaves the amide bond between ATG8 and PE (Kirisako et al., 2000). This deconjugating activity of ATG4 releases ATG8 from PE in membranes and plays an important role in regulating autophagy by allowing ATG8 recycling (Nair et al., 2012; Nakatogawa et al., 2012; Yu et al., 2012). Using an *atg8* mutant that bypassed the initial ATG4-dependent processing, a study of yeast demonstrated that blocking the deconjugation of ATG8-PE resulted in a defect in autophagosome biogenesis (Nair et al., 2012). In addition, ATG4 also acts to compensate for the intrinsic defects in the lipidation system by recycling the ATG8 that is generated on inappropriate membranes to maintain a reservoir of de-lipidated ATG8, which is required for autophagosome formation at the phagophore assembly site (PAS) (Nakatogawa et al., 2012). These data collectively show that ATG4 plays crucial roles in the conjugation and deconjugation of ATG8 and that both functions are indispensable for autophagy; therefore, its activity is expected to be tightly regulated. Thus, after the initial cleavage of ATG8 proteins,

ATG4 can be inactivated to ensure the conjugation of ATG8 proteins to the autophagosomal membrane. Then, ATG4 may be locally reactivated to de-lipidate and recycle the ATG8 proteins when the autophagosome fuses with the lysosome. The precise control of ATG4 activity determines whether autophagy subsequently occurs.

The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the regulation of autophagy has been shown by several studies performed in different organisms. In mammals, nutrient limitation leads to increased levels of hydrogen peroxide (H_2O_2), which in turn induce autophagy. The cysteine protease HsATG4 has been identified as a direct target of oxidation and inhibition by H_2O_2 , and a cysteine residue (Cys⁸¹) located near the cysteine (Cys⁷⁷) in the HsATG4 catalytic site was shown to be critical for this regulation. In addition, the inhibition of HsATG4 by H_2O_2 was reversible. This regulation mainly targets the de-lipidating activity of HsATG4, which suggests that the accumulation of lipidated ATG8 under starvation conditions might result from the inhibition of ATG4 activity during the de-lipidation process (Scherz-Shouval et al., 2007a).

Another study conducted in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* has reported similar results: ROS can activate autophagy, and ScATG4 is the target of this redox regulation. ScATG4 is regulated by the oxidoreduction of a single disulfide bond between two cysteine residues, Cys³³⁸ and Cys³⁹⁴, which is very efficiently reduced by thioredoxin (Trx). *In vivo* studies indicated that Cys³³⁸ and Cys³⁹⁴ are required for the proper regulation of autophagosome biogenesis, because mutation of these cysteines resulted in increased recruitment of ATG8 to the PAS (Pérez-Pérez et al., 2014).

Two different AtATG4 isoforms are present in *Arabidopsis thaliana*, and the activity of both AtATG4s is reversibly inhibited *in vitro* by reactive oxygen species, such as H_2O_2 . However, the redox regulation of cysteine residues analogous to what has been described in mammals and yeast has not been reported. In addition, it has been concluded that the AtATG4a is the predominant protease and is more active in the processing of the AtATG8 isoforms (Woo et al., 2014).

In our previous investigation of the role of hydrogen sulfide (H_2S) as a negative regulator of autophagy induced by nitrogen starvation in *A. thaliana* roots, we determined that the mechanism of action of H_2S was independent of the involvement of ROS such as hydrogen peroxide or superoxide anions (Laureano-Marín et al., 2016). The other possible mechanism of action proposed for H_2S involves a posttranslational modification (PTM) on cysteine residues of proteins to produce a biological response; this type of PTM is known as S-sulfhydration. Recently, we have demonstrated that S-sulfhydration occurs in *Arabidopsis* under physiological conditions and that this PTM has a biological significance. For instance, this modification modifies the enzymatic activities of some proteins, such as ascorbate peroxidase (APX), glutamine synthetase (GS) and glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase (GAPDH), in a reversible manner (Aroca et al., 2015).

In this study, we sought to determine if the protease AtATG4a is a target of S-sulphydration *in vitro* and if this modification regulates the activity of AtATG4a using an enzymatic assay with the *C. reinhardtii* CrATG8 protein as the substrate.

RESULTS AND DISCUSSION

AtATG4a is S-sulphydrated *in vitro*

In a previous study, we reported that the mechanism by which sulfide regulates autophagy in *Arabidopsis* is independent of its antioxidant properties. Therefore, we want to further determine whether S-sulphydration, the proposed second mechanism of action of sulfide, is involved in the regulation of autophagy in plants. One of the putative targets of S-sulphydration could be AtATG4a from *A. thaliana*, which is the predominant ATG4 protease in this species of plant (Woo et al., 2014) and has 12 cysteine residues in its sequence. For this experiment, the full-length cDNA clone (At2g44140) was expressed in *E. coli* as an N-terminally 6x His-tagged recombinant protein and purified by affinity chromatography using Ni-NTA resin under hybrid conditions (Figure 1). The eluted fraction that was selected for further analysis showed two main protein bands, the upper and more abundant protein band with an approximate 53 kDa molecular weight corresponds to the recombinant AtATG4a protein, which was confirmed by mass spectrometry analysis and a lower and less abundant band that was co-purified with the main band.

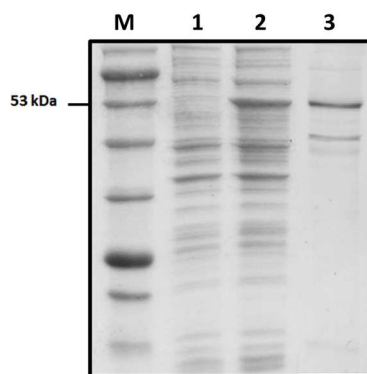


Figure 1. Purification of the AtATG4a recombinant protein, as shown by SDS-PAGE. The proteins were separated on a 12% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue. Lanes 1 and 2, fractions from the uninduced cell cultures and cultures that were induced with L-arabinose for 2.5 h, respectively. Lane 3, fraction eluted from the Ni-NTA agarose column. The molecular weight markers are also shown. M, molecular weight marker.

Due to the controversy that has arisen in relation to the specificity of the modified biotin switch method, a new method for detecting the posttranslational modification of proteins by S-

sulfhydrylation, i.e., the Tag-Switch Assay, has been described (Figure 2A) (Zhang et al., 2014). In the first step of this new method, the blocking reagent methylsulfonyl benzothiazole (MSBT) reacts with both thiol and persulfide groups to form corresponding blocked adducts that exhibit different reactivities. Although the thiol adducts are thiol ethers that do not react with nucleophiles, the persulfide adducts are disulfides that are strongly reactive with certain carbon-based nucleophiles, such as the cyanoacetate-based reagent CN-biotin. Therefore, the persulfide residues are converted to biotin-labeled adducts. These labeled proteins can be then detected by immunoblotting using anti-biotin antibodies.

The Tag-Switch Assay was used to determine whether AtATG4a is susceptible to modification by this class of PTM *in vitro*. His-tagged recombinant GAPDH was used as a positive control for S-sulfhydrylation, as was previously described in Aroca et al. (2015). In addition, the pretreatment of GAPDH with reduced DTT transforms the persulfide groups into thiols groups and avoids S-sulfhydrylation and was used as a negative control for the method. When an immunoblot analysis was performed using antibodies against biotin, both the positive control GAPDH and AtATG4a, but not the DTT pretreated-GAPDH, were recognized by the antibodies (Figure 2B). These results clearly show that AtATG4a is sulfhydrylated *in vitro* and suggest that S-sulfhydrylation could be the mechanism by which sulfide regulates autophagy in plants.

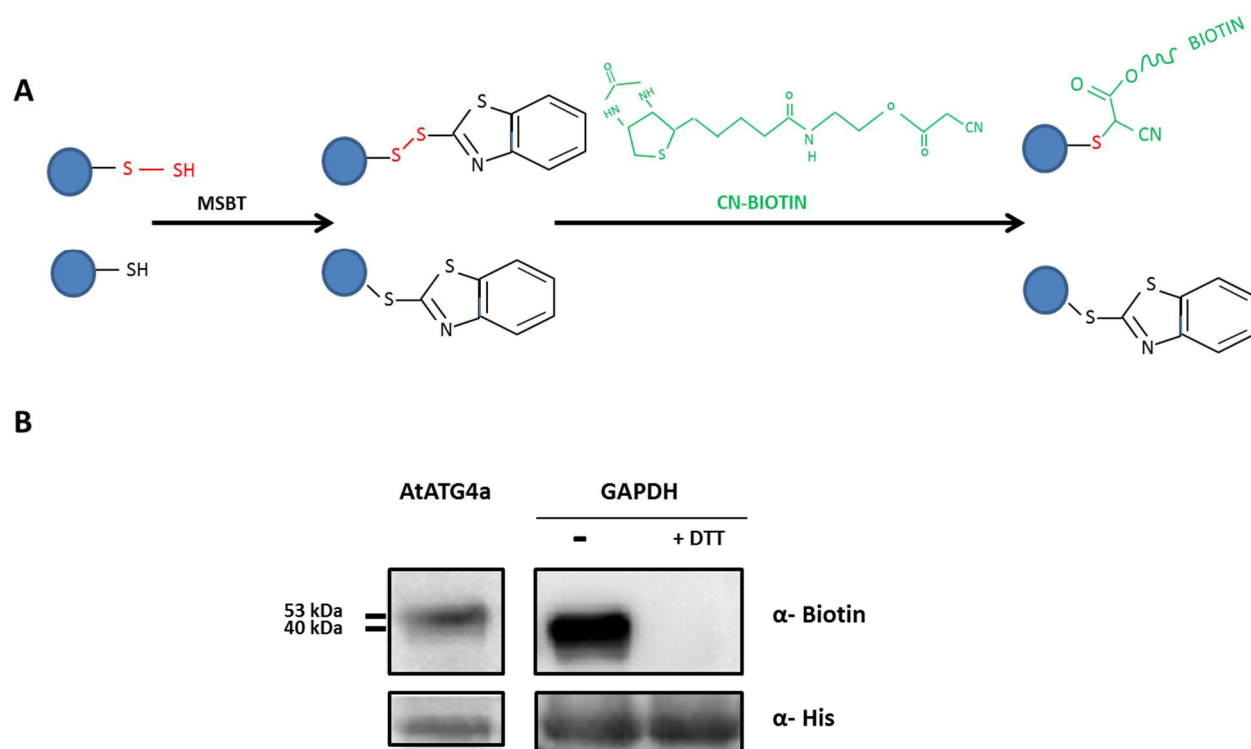


Figure 2. A, Schematic representation of the Tag-Switch Assay used to detect posttranslational modification of proteins by S-sulfhydrylation, where the free thiol and persulfide residues are first blocked with MSBT and then only the blocked persulfides react with CN-biotin to form biotin-labeled proteins. B,

Purified recombinant AtATG4a was subjected to the Tag-Switch Assay (left panel), and purified recombinant GAPDH that had been treated with or without 1 mM DTT was used as a positive and negative control for S-sulhydrated proteins (right panel), respectively. The anti-histidine western blot is shown as the protein loading control.

AtATG4a is able to process CrATG8

To determine whether the modification of AtATG4 by S-sulhydration could have an effect on its biological activity, we first had to develop an enzyme activity assay. ATG4 processes ATG8 at a conserved glycine residue located at the C-terminus of ATG8 (Kirisako et al., 2000). For the ATG4 activity assays, we employed CrATG8 from *C. reinhardtii*, as previously described (Pérez-Pérez et al., 2014), instead of using *Arabidopsis* ATG8 isoforms because *Arabidopsis* has nine different ATG8 isoforms, and none of them possess more than five amino acid residues behind the glycine (Doelling et al., 2002). In contrast, CrATG8 harbors a 15-amino acid extension after the glycine, allowing the detection and quantification of the unprocessed (ATG8) and processed (pATG8) forms of ATG8 in Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gels. Purified AtATG4a was found to be active on CrATG8. The activity was determined in a standard ATG4 activity buffer containing the reducing agent DTT (dithiothreitol) at a concentration of 1 or 50 mM, and the processed CrATG8 protein was detected after a 2 or 4 h treatment (Figure 3). The presence of a small concentration of reduced DTT is necessary for ATG4 to adopt the monomeric form (indicated by the white arrowhead in Figure 3), which is required to determine its activity. However, it is not known if the formation of ATG4 oligomers (indicated by the black line in Figure 3) also occurs *in vivo* or whether it has a regulatory function under certain conditions. Yeast ScATG4 requires a lower concentration of DTT (25 μ M) to achieve the monomeric conformation without being activated, as previously described (Pérez-Pérez et al., 2014); however, its *Arabidopsis* counterpart requires a higher concentration of DTT (100 μ M) to leave the aggregated state, as will be described below. This result suggests that the *Arabidopsis* protein is less susceptible to forming the monomer than its yeast counterpart.

The processing of CrATG8 by AtATG4a increases as the concentration of DTT increases and with the time of incubation (Figure 3). Therefore, the *Arabidopsis* ATG4a protein shows a similar behavior as described for this protein in yeast, because a reducing agent is required to activate the protein (Pérez-Pérez et al., 2014).

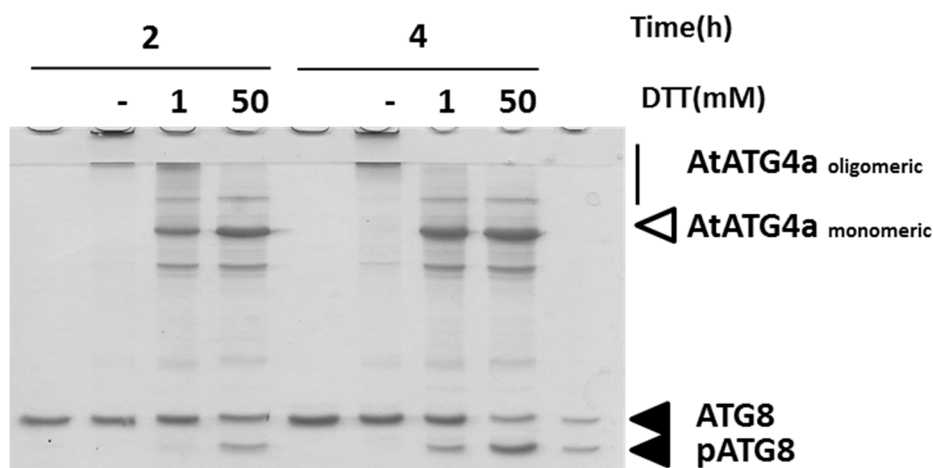


Figure 3. AtATG4a is able to process CrATG8. ATG4 activity was monitored by following the cleavage of CrATG8 (5 μM) from the unprocessed (CrATG8) to the processed (pATG8) forms (indicated by the black arrowheads) using SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. The purified AtATG4a fraction was incubated with or without 1 mM or 50 mM DTT and the purified CrATG8 protein for 2 or 4 h. The last lane shows a positive control, in which CrATG8 has been processed by CrATG4.

AtATG4a does not monomerize in the presence of H₂S

Next, we wanted to test whether the sulfide treatment of AtATG4a could lead to a change in the aggregation state of the protein analogous to the change that occurs in the presence of reduced DTT or thioredoxin, thus promoting the activation of yeast ATG4 (Pérez-Pérez et al., 2014). For this purpose, we incubated the recombinant protein in presence of increasing concentrations of NaSH, a compound that releases H₂S, without pre-exposing it to DTT and performed the ATG4 activity assay by monitoring CrATG8 cleavage. The results revealed that hydrogen sulfide did not affect the protein aggregation state, at least at the concentrations tested in our assay, and only DTT induced AtATG4a monomerization and activation at a suitable concentration (1 mM) (Figure 4).

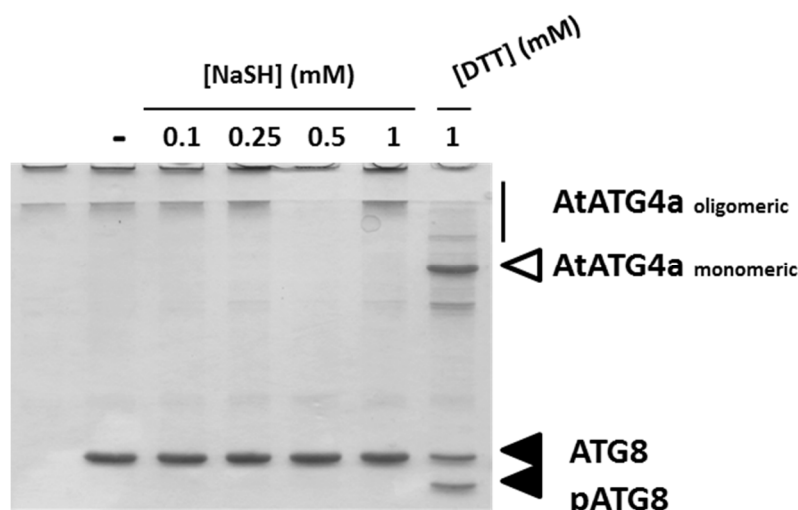


Figure 4. AtATG4a does not monomerize in presence of NaSH. ATG4 activity was monitored as in Figure 3. AtATG4a was incubated with or without NaSH in concentrations ranging from 100 μ M to 1 mM (lanes 2-6) and the purified CrATG8 protein for 4 h at 25°C. Monomerization and activation by 1 mM DTT for 4 h at 25°C was used as a positive control (lane 7). Lane 1, AtATG4a alone.

Hydrogen sulfide does not activate the monomeric form of AtATG4a

Based on previous work on yeast ATG4, which requires pretreatment with a low concentration of DTT (25 μ M) to form an inactive ATG4 monomer and higher DTT concentrations to yield significant ATG4 activity (Pérez-Pérez et al, 2014), we hypothesized that sulfide may activate the inactive monomeric AtATG4 based on its reductant properties. Therefore, AtATG4a was pretreated with a low concentration of DTT (100 μ M), which could lead to partial monomerization of the protein and thereby facilitate the exposure of the cysteine residues that are capable of being S-sulphydrated to activate the protein. Then, AtATG4a was incubated with NaSH (100 μ M) to test whether this compound activated the protein, and AtATG4 was finally treated with 1 mM DTT to promote full activation.

The result showed that H₂S, at least under our experimental conditions, was unable to activate the monomeric AtATG4a and promote CrATG8 cleavage and that a high concentration of DTT was required to promote cleavage (Figure 5).

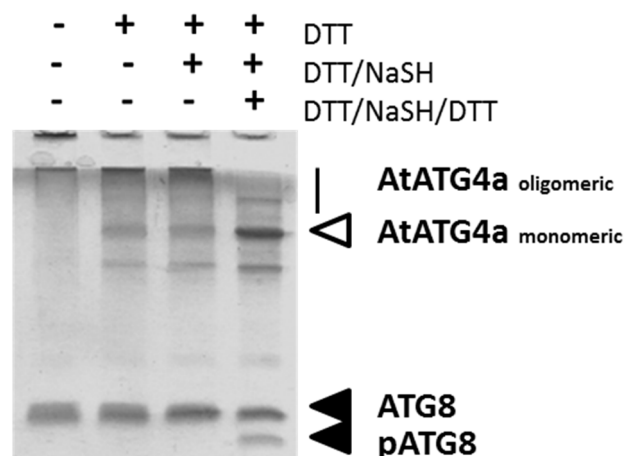


Figure 5. NaSH does not activate ATG4. ATG4 activity was monitored as in Figure 3. Purified ATG4 was pretreated with 100 μ M DTT for 4 h (lanes 2 to 4) and then treated with 100 μ M NaSH for 30 min (lanes 3 and 4), followed by a 30 min incubation with 1 mM DTT (lane 4). Finally, ATG8 processing was analyzed after a 2 h incubation. All the steps were performed at 25 °C. Untreated AtATG4a was used as a negative control (lane 1).

Hydrogen sulfide inhibits the cleavage of CrATG8 by AtATG4a

From the results obtained so far, we could infer that the effect of sulfide, and probably the S-sulfhydrylation of ATG4, do not imply an improvement in the monomeric state of the protein or in the activation of the monomeric form.

Starting from a situation in which AtATG4a was in its monomeric and active form, we determined whether NaSH was able to inhibit ATG4 activity to some extent. For this experiment, the AtATG4a protein was pretreated with 1 mM DTT to produce a portion of this protein in the active, monomeric state, which was then incubated with 1 mM NaSH and finally treated with a higher DTT concentration (50 mM) to reverse the possible sulfide inhibition and promote complete activation of AtATG4a. The results showed that NaSH caused a significant inhibition of the ATG4 activity, which was observed as an increase in the accumulation of unprocessed ATG8, and this inhibition could be reversed when the protein was incubated with higher concentrations of DTT (Figure 6).

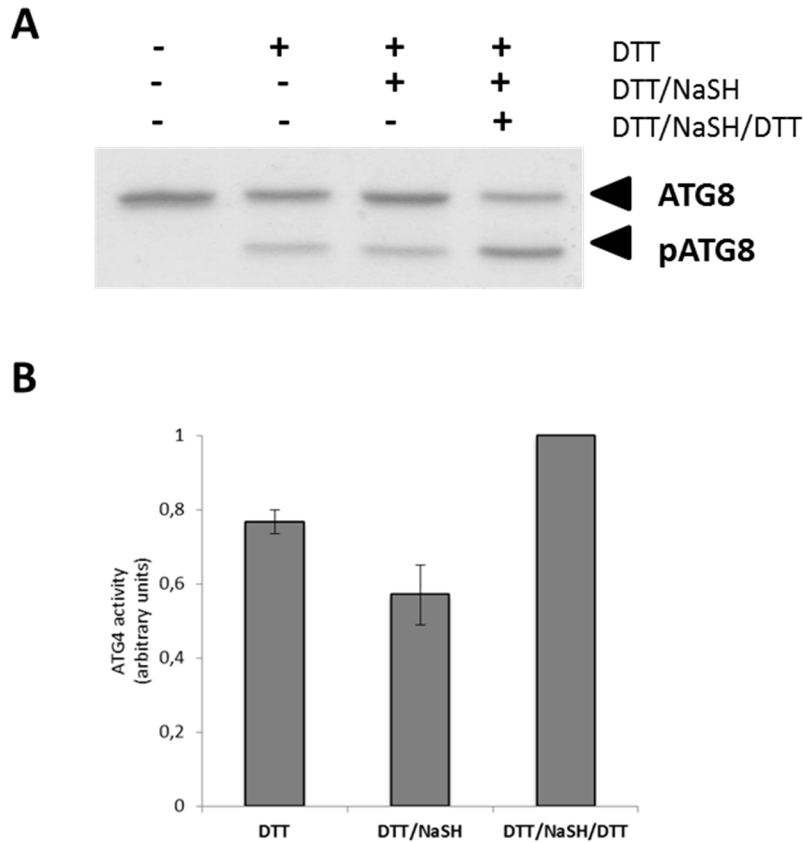


Figure 6. Hydrogen sulfide inhibits the processing of CrATG8 by AtATG4a. ATG4 activity was monitored as in Figure 3. A, Purified AtATG4a was pre-reduced and activated with 1 mM DTT for 2 h (lanes 2 to 4) and then treated with 1 mM NaSH for 30 min (lanes 3 and 4), followed by a 30 min incubation with 50 mM DTT (lane 4). Finally, ATG8 processing was analyzed after a 4 h incubation. All the steps were performed at 25 °C. Untreated AtATG4a was used as a negative control (lane 1). B, Quantification of ATG4 activity from A. The reference sample for quantification (ATG4 activity = 1 in arbitrary units) was the sample that had been successively treated with 1 mM DTT, 1 mM NaSH and 50 mM DTT.

Our previous findings have shown the role of sulfide in regulating autophagy. Thus, sulfide and no other sulfur-containing molecule is able to inhibit autophagy in *Arabidopsis* leaves *in vivo*, both in the *des1* mutant and in the carbon-starved wild type plants, and in *Arabidopsis* roots under nitrogen deprivation (Álvarez et al., 2012b; Laureano-Marín et al., 2016). The results obtained in this work are in accord with our previous results, as the negative regulation of autophagy by hydrogen sulfide *in vivo* might be due to the inhibition of the proteolytic activity of AtATG4a by the S-sulfhydration of some cysteine residue(s), which ultimately cause a decrease in the autophagy level. We must keep in mind that the hypothesis is that the regulation of the proteolytic activity of ATG4 by redox conditions concerns the de-lipidation of the ATG8-PE adduct and not the cleavage of the newly synthesized ATG8 (Scherz-Shouval et

al., 2007a), as shown in this work. Therefore, our results suggest a new level of regulation of ATG4 activity by sulfide that corresponds to ATG8 processing prior to conjugation to PE.

Thus, it has been recently proposed that for S-sulfhydration to occur, the target thiol cysteine residue must be previously oxidized by ROS, but only to the sulfenic form (R-SOH) (Krishnan et al., 2011). Some authors have proposed the existence of an oxidative gradient in the cell, with an environment rich in H₂O₂ near the ROS-producing organelles and poor in H₂O₂ near the remote organelles, such as the lysosomes or vacuoles (Scherz-Shouval and Elazar, 2007b). This difference in oxidizing environments within the cell allows ATG4 to be oxidized and thereby be inactivated (for de-lipidating activity) at the site of autophagosome formation, promoting the lipidation of ATG8, an essential step in the activation of autophagy. As the autophagosome matures towards fusion with the vacuole, its localization apparently changes to an H₂O₂-poor environment where ATG4 is active and can de-lipidate and recycle ATG8.

Based on the proposed mechanism of S-sulfhydration in which, depending on the local environment, the thiol group of the Cys residue forms a thiolate anion (R-S⁻) that can be subsequently oxidated by ROS to generate a sulfenic residue (R-SO), the latter of which further reacts with sulfide (as HS⁻ or H₂S) to form the final persulfide group (-SSH) (Krishnan et al. 2011), we propose a model by which S-sulfhydration regulates autophagy. Our model suggests that at the site of autophagosome formation, the S-sulfhydration of pre-oxidized cysteine residues inactivates the proteolytic activity of AtATG4a on the ATG8 precursors. Thus, this inactivation would limit the formation of the ATG8-PE adduct, affecting *de novo* autophagosome synthesis and resulting in a decrease in the level of autophagy. However, there are two *Arabidopsis* ATG8 isoforms that do not need to be processed by ATG4, AtATG8h and AtATG8i, although the specific roles of these isoforms in the process of autophagy are not known (Doelling et al., 2002). This model is consistent with our previous results showing that autophagy is inhibited in the presence of sulfide, regardless of the presence of ROS in the cell (Laureano-Marín et al, 2016).

Recently, it has been shown that Trx acts as a depersulfidase in mammals to control the intracellular levels of protein S-sulfhydration (Wedmann et al., 2016). In yeast, Trx regulates ATG4 activity by efficiently reducing a disulfide bond established between two regulatory cysteine residues (Pérez-Pérez et al., 2014). In addition, a quantitative proteomic approach has identified Trx and Trx reductase as autophagosome-associated proteins (Dengjel et al., 2012). Therefore, Trx could participate in modulating the activity of AtATG4 by acting as a depersulfidase for previously S-sulhydrated AtATG4.

MATERIALS AND METHODS

Expression of AtATG4a in *Escherichia coli* using Gateway Technology

Total RNA was extracted from wild-type *Arabidopsis* leaves using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) and reverse transcribed using an oligo (dT) primer and the SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Subsequently, a 1,404-bp sequence encoding the full-length ATG4a (At2g44140) protein was amplified by PCR using the primers ATG4-F: CACCATGAAGGCTTTATGTGA and ATG4-R: ATGACTGGCAAATGCTCTGA and the proofreading Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen). The PCR conditions were: a denaturation cycle of 2 min at 94°C, followed by 30 amplification cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 57°C, and 1 min at 68°C. The amplified cDNA was then ligated into the pENTR/D-TOPO vector using the pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Positive clones were identified by PCR and chosen for plasmid DNA isolation. The *AtATG4a* cDNA was then cloned into the expression vector pDEST17 using the *E. coli* Expression System with Gateway Technology (Invitrogen), which allowed us to generate a fusion protein with an N-terminal 6x His tag that was confirmed by sequencing, and its expression was induced with L-arabinose in BL21-AI *E. coli* cells.

Purification of the recombinant AtATG4a protein

The 6x His-tagged recombinant protein was isolated from 200 mL of BL21-AI *E. coli* cells that were cultured at 37°C to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.5 and then induced with 0.2% L-arabinose for 2.5 hours at 37°C. Prior to purification, His-tagged ATG4a was solubilized with 6 M urea because the recombinant protein was contained in inclusion bodies. Then, the protein was purified from the soluble fraction by nickel affinity chromatography using the Ni-NTA Purification System (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The purified protein was concentrated and desalted using 10K cutoff-pore size centrifugal filter units (Millipore). The protein was quantified with the Bradford assay (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions, and BSA (Thermo Scientific) was used as a standard. The purified proteins were confirmed by SDS-PAGE using 12% (w/v) polyacrylamide gels, followed by Coomassie Blue staining.

In vitro detection of S-sulfhydrated proteins by Tag-Switch Assay

Purified recombinant ATG4a was subject to the Tag-Switch Assay, as previously described by Zhang et al., 2013 (Figure 2A). Recombinant GAPDH was used as a positive control for S-sulfhydration (Aroca et al., 2015). The control protein was pretreated with or without 1 mM DTT for 30 min at 4°C to reduce all persulfide groups. Then, the sample was dialyzed to eliminate the residual DTT before performing the Tag-Switch Assay.

The recombinant proteins were precipitated with acetone for 20 min at -20°C and then centrifuged at maximum speed (16,000 g) for 20 min at 4°C. After acetone removal, the proteins were resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8) buffer supplemented with 2.5% (w/v) SDS. Then, the samples were mixed with the following blocking buffer: 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, supplemented with 2.5% (w/v) SDS and 50 mM methylsulfonyl benzothiazole (MSBT). The solution was incubated at 37°C for 2 hours to block the free sulfhydryl and persulfide groups. The MSBT was then removed and the proteins were precipitated with acetone for 20 min at -20°C. The acetone was removed and the proteins were resuspended in the same Tris-HCl buffer supplemented with 2.5% (w/v) SDS. The S-sulhydrated proteins were then labeled with 20 mM cyano-biotin (CN-biotin) for 4 hours at 37°C with agitation. The CN-biotin reagent is a non-commercial reagent, and it was synthesized by the “Bioorganic and Supramolecular Carbohydrate Chemistry Group” at the Institute for Chemical Research. The CN-biotinylated proteins were detected using an immunoblot assay with anti-biotin antibodies (Abcam) as described below. We employed anti-histidine antibodies (Sigma) to detect the histidine tags in the recombinant AtATG4a and GAPDH proteins as loading controls (Figure 2B).

Immunoblot Analysis

The recombinant proteins that had been subjected to the Tag-Switch Assay (20 µg of AtATG4a and 5 µg of GAPDH) were separated using reducing SDS-PAGE on 12% (w/v) polyacrylamide gels before being transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad) according to the manufacturer’s instructions. The anti-biotin (Abcam), anti-histidine (Thermo Fisher) and secondary antibodies were diluted 1:500,000, 1:1,000 and 1:100,000, respectively, and an ECL Select Western Blotting Detection Reaction (GE Healthcare) was used to detect the proteins that had been labeled horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibodies.

***In vitro* analysis of the protease activity of ATG4 on ATG8**

The reaction mixture contained 4.5 µM ATG4, 5 µM ATG8 and 1 mM EDTA in Tris-buffered saline (50 mM Trizma base, 138 mM NaCl, and 27 mM KCl, pH 8). When indicated, AtATG4a was incubated in presence of DTT or NaSH compounds alone or in combination at the indicated times and concentrations. The reaction mixtures were incubated for the indicated times at 25°C and stopped by the addition of β-mercaptoethanol-free Laemmli sample buffer, followed by 5 min of boiling. The proteins were resolved on 15% SDS-PAGE gels and stained with Coomassie Blue. The gels were scanned with a GS-800 densitometer (Bio-Rad) and the signals corresponding to unprocessed (ATG8) and processed (pATG8) ATG8 were quantified with the Quantity One software (Bio-Rad) to quantify ATG4 activity. ATG4 activity was

considered as the relation between pATG8/(ATG8+pATG8) and it normalized between 0 and 1, with 0 corresponding to totally oxidized, inactive ATG4 and 1 corresponding to maximally reduced, active ATG4 achieved using our conditions. The ATG4 activities (in arbitrary units) were plotted using the appropriate software.

REFERENCES

- Álvarez C, García I, Moreno I, Pérez-Pérez ME, Crespo JL, Romero LC, Gotor C (2012b) Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 4621-4634
- Aroca A, Serna A, Gotor C, Romero L, C. (2015) S-sulfhydration: a cysteine posttranslational modification in plant systems. *Plant Physiology* **168**: 334-342
- Dengjel J, Høyer-Hansen M, Nielsen MO, Eisenberg T, Harder LM, Schandorff S, Farkas T, Kirkegaard T, Becker AC, Schroeder S (2012) Identification of autophagosome-associated proteins and regulators by quantitative proteomic analysis and genetic screens. *Molecular & Cellular Proteomics* **11**: M111. 014035
- Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD (2002) The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **277**: 33105-33114
- Downes B, Vierstra R (2005) Post-translational regulation in plants employing a diverse set of polypeptide tags. *Biochemical Society Transactions* **33**: 393-399
- Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, Yoshimori T (2008) An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Molecular biology of the cell* **19**: 4651-4659
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* **151**: 263-276
- Klionsky DJ (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 931-937
- Krishnan N, Fu C, Pappin DJ, Tonks NK (2011) H₂S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci Signal* **4**: ra86
- Laureano-Marín AM, Moreno I, Romero LC, Gotor C (2016) Negative regulation of autophagy by sulfide in Arabidopsis thaliana is independent of reactive oxygen species. *Plant Physiology*: pp. 00110.02016
- Li F, Vierstra RD (2012) Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci* **17**: 526-537
- Nair U, Yen W-L, Mari M, Cao Y, Xie Z, Baba M, Reggiori F, Klionsky DJ (2012) A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy* **8**: 780-793
- Nakatogawa H, Ishii J, Asai E, Ohsumi Y (2012) Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy* **8**: 177-186
- Pérez-Pérez ME, Zaffagnini M, Marchand CH, Crespo JL, Lemaire SD (2014) The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy* **10**: 1953-1964
- Scherz-Shouval R, Elazar Z (2007b) ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* **17**: 422-427
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z (2007a) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal* **26**: 1749-1760
- Wedmann R, Onderka C, Wei S, Sziártó IA, Miljkovic JL, Mitrovic A, Lange M, Savitsky S, Yadav PK, Torregrossa R (2016) Improved tag-switch method reveals

that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation. *Chemical Science* **7**: 3414-3426

Woo J, Park E, Dinesh-Kumar SP (2014) Differential processing of Arabidopsis ubiquitin-like Atg8 autophagy proteins by Atg4 cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 863-868

Yu Z-Q, Ni T, Hong B, Wang H-Y, Jiang F-J, Zou S, Chen Y, Zheng X-L, Klionsky DJ, Liang Y (2012) Dual roles of Atg8- PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* **8**: 883-892

Zhang D, Macinkovic I, Devarie-Baez NO, Pan J, Park C-M, Carroll KS, Filipovic MR, Xian M (2014) Detection of Protein S-Sulfhydration by a Tag-Switch Technique. *Angewandte Chemie International Edition* **53**: 575-581

Discusión

Como se ha descrito en apartados anteriores, la importancia de la cisteína en las plantas no sólo se debe a su papel como aminoácido proteinogénico, sino también a su función como precursor de moléculas biológicas esenciales y compuestos de defensa (Romero et al., 2014). En la biosíntesis de cisteína participan las enzimas serina acetiltransferasa (SAT) y O-acetilserina(tiol)liasa (OASTL). Por su parte, el catabolismo de la cisteína depende de la actividad enzimática L-cisteína desulfhidrasa de DES1 que cataliza la desulfuración de L-cisteína para producir sulfuro, amonio y piruvato (Romero et al., 2014) siendo hasta la fecha la única enzima con dicha actividad caracterizada bioquímicamente en plantas. El mantenimiento de la homeostasis de cisteína en el citosol de *A. thaliana* se produce a través de la acción coordinada de las actividades enzimáticas de OAS-A1 y DES1.

La caracterización funcional de la proteína DES1 ha sido llevada a cabo por nuestro grupo de investigación y ha permitido un cambio en la visión que se tenía de esta proteína. Así, DES1 ha pasado de ser considerada una proteína minoritaria dentro de la familia OASTL, a la que se le atribuía una función auxiliar, a convertirse en una enzima esencial que regula la homeostasis de cisteína y modula la generación de sulfuro con fines señalizadores en el citosol de *A. thaliana* (Gotor et al., 2014; Romero et al., 2014). Conocer la localización tisular y estudiar la regulación de esta enzima puede ayudarnos a entender las bases moleculares de la función de DES1.

Este objetivo ha sido abordado en la primera parte de esta Tesis Doctoral donde hemos estudiado la regulación transcripcional del gen *DES1*. Para llevar a cabo este objetivo, hemos realizado una búsqueda de posibles elementos reguladores dentro de la región promotora de *DES1* mediante el empleo de diferentes herramientas disponibles en la web, lo que ha permitido la identificación de diferentes elementos *cis* que apuntan a una regulación hormonal de su expresión. En una segunda aproximación experimental, hemos analizado la expresión génica de *DES1* mediante qRT-PCR en plantas silvestres a lo largo de su desarrollo.

Por otra parte, hemos clonado las 3 Kb de la región intergénica comprendida entre *DES1* y el gen situado aguas arriba, que contienen el promotor de *DES1*, y la hemos fusionado con el gen reportero *GFP* (“Green Fluorescent Protein”) para poder realizar un seguimiento de su expresión mediante microscopía confocal. El análisis espacial y temporal de la expresión de *DES1* ha revelado que, a pesar de ser una proteína ubicua, la mayor expresión se registra en las hojas durante las etapas iniciales y finales del desarrollo y en los tejidos reproductivos en las etapas más tardías.

A pesar de su ubicuidad, DES1 es una proteína muy poco abundante, lo que ha sido confirmado mediante un análisis proteómico realizado en la planta modelo *A. thaliana* donde se ha identificado un pequeño número de péptidos pertenecientes a esta proteína (“AtProteome Database”). De igual forma, los niveles de transcrito del gen *DES1* son también muy bajos. De hecho, el nivel de expresión del gen *DES1* es aproximadamente dos órdenes de magnitud

inferior al que presenta el gen *OAS-A1*, algo fácil de verificar mediante el empleo de los recursos disponibles en las bases de datos (www.genevestigator.com).

Los resultados obtenidos del estudio de la expresión de *GFP* dirigida por el promotor de *DES1* muestran que la expresión de *GFP* es, sin embargo, relativamente alta. Esta aparente contradicción puede explicarse si se asume que *DES1* puede estar regulado a nivel post-transcripcional y/o post-traducciona. Esta hipótesis tiene sentido si se tiene en cuenta la función de esta proteína en la generación de sulfuro implicado en la regulación de distintos procesos fisiológicos como la autofagia (Álvarez et al., 2012b; Gotor et al., 2013; Romero et al., 2013). El sulfuro es una molécula tóxica que en los últimos años ha sido reconocida también como una molécula señal en sistemas animales y vegetales (Gadalla and Snyder, 2010; Wang, 2012; Garcia-Mata and Lamattina, 2013; Lisjak et al., 2013; Calderwood and Kopriva, 2014; Hancock and Whiteman, 2014). La generación de sulfuro en el citosol de *A. thaliana* debe estar, por tanto, controlada de forma muy precisa con el fin de mantener unos niveles óptimos necesarios para ejercer su función señalizadora y para evitar efectos perjudiciales provocados por el aumento de su concentración por encima del umbral de toxicidad.

El análisis del perfil transcripcional de *DES1* en diferentes tejidos a lo largo del desarrollo muestra que la máxima expresión de *DES1* tiene lugar en las hojas durante las etapas iniciales y finales del desarrollo de la planta y en los tejidos reproductivos (flores y silicuas). Estos resultados apuntan a que *DES1* puede desempeñar un papel específico durante esos estadios del desarrollo. Además, estos datos se ajustan bien con los obtenidos mediante el estudio de mutantes nulos *des1*, en los que las principales diferencias fenotípicas se observan en esas mismas etapas. Durante las fases más tempranas del desarrollo, los mutantes *des1* son más tolerantes a la presencia de cadmio que las plantas silvestres (Álvarez et al., 2010). En estadios más avanzados, la mutación en el gen *DES1* tiene importantes consecuencias en el desarrollo normal de la planta. Así, las plantas mutantes *des1* presentan una senescencia prematura de las hojas, una alteración del perfil transcripcional y una inducción de la autofagia (Álvarez et al., 2012b). Por ello, la función de *DES1* parece ser crítica en esta última etapa del crecimiento.

El análisis de la expresión de *GFP* dirigida por el promotor de *DES1* en los tejidos vegetativos se correlaciona con el patrón de expresión de *DES1* observado previamente. En las plántulas, la fluorescencia se extiende homogéneamente por toda la hoja, detectándose señal en el citosol de las células de la epidermis, del mesófilo, así como en el de las células guarda y los tricomas. Sin embargo, un examen más detallado de la hoja muestra unas zonas distribuidas a lo largo del margen foliar que presentan una mayor expresión de *GFP*. Estas zonas se corresponden con los hidátodos, unas estructuras especializadas similares a poros que actúan como punto de salida de los tejidos vasculares donde el agua y los iones son liberados desde el xilema. También se ha sugerido que los hidátodos están implicados en la reabsorción de los iones procedentes de otros tejidos a través del floema (Nagai et al., 2013). El número de

hidátodos presentes en una hoja aumenta con el tamaño de la misma y coincide espacialmente con zonas que presentan una alta acumulación de auxinas (Teale et al., 2006; Wang et al., 2011). La alta expresión de GFP en los hidátodos junto con la identificación en el promotor de *DES1* de elementos de respuesta a auxinas nos llevó a pensar en una posible regulación de *DES1* por este tipo de hormona. Para demostrarlo, realizamos la cuantificación del transcrito del gen *DES1* en plantas silvestres de *Arabidopsis* cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de la auxina ácido indol acético (IAA) y determinamos que el IAA produce una represión del gen *DES1*. Sin embargo, estos resultados son contradictorios con el patrón de acumulación de GFP observado en los hidátodos que, por el contrario, apuntaba a una relación directa entre la acumulación de auxinas y la expresión de *DES1*. Esto puede explicarse teniendo en cuenta la complejidad de los mecanismos que controlan la acción de las auxinas que dependen de una serie de procesos que incluyen la biosíntesis, la conjugación, el catabolismo y el transporte de dicha hormona. Aunque en este trabajo no hemos podido esclarecer la implicación específica de *DES1* en este aspecto, lo que sí sugerimos es la existencia de una interacción entre *DES1* y la señalización mediada por auxinas. De forma análoga, realizamos la cuantificación del transcrito del gen *OAS-AI*, y observamos que su expresión, a diferencia de lo que ocurre con *DES1*, se induce en presencia de IAA. Además, el promotor del gen *OAS-AI* también presenta elementos de respuesta a auxinas (Gutiérrez-Alcalá, 2007) lo que parece indicar que existe una interconexión entre estas proteínas relacionadas con el metabolismo del azufre y las auxinas.

La relación entre el azufre y las auxinas ha sido demostrada con anterioridad por el análisis transcripcional de plantas sometidas a deficiencia de azufre. Estas plantas presentan inducidos algunos genes implicados en la biosíntesis de auxinas, lo que parece indicar que estas hormonas participan en la respuesta de la planta a la carencia de azufre (Hirai et al., 2003; Nikiforova et al., 2003). Otro estudio ha determinado que algunos de los factores de transcripción que median la respuesta a auxinas participan también en la coordinación de los cambios metabólicos inducidos por la carencia de azufre (Falkenberg et al., 2008).

Las auxinas regulan numerosos procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas, como la senescencia y la organogénesis radicular. En relación con la regulación de la senescencia, hay líneas de investigación que sugieren que las auxinas provocan un retraso de la senescencia (Lim et al., 2010) mientras que otras respaldan que las auxinas promueven la senescencia (Hou et al., 2013). En cualquier caso, el fenotipo de senescencia prematura así como la inducción de genes sensibles a auxinas como *SAUR* en el perfil transcripcional de los mutantes *des1*, sugieren que *DES1* está regulada por auxinas (“Gene Expression Omnibus” repositorio GSE32566) (Álvarez et al., 2012b). La interconexión entre el sulfuro y las auxinas en la regulación del desarrollo del sistema radicular ha sido puesta de manifiesto. Algunos autores han demostrado que el sulfuro promueve el desarrollo de raíces adventicias en un proceso regido por las auxinas y en cuya

cascada de señalización participa el NO (Zhang et al., 2009). Otro estudio ha descrito que el tratamiento con auxinas provoca un incremento del transcrito y la actividad de DES1 con el consiguiente aumento del contenido endógeno de H₂S en plantas de tomate, lo que favorece la formación de raíces laterales. Mediante ensayos farmacológicos han concluido que el H₂S es un componente de la vía de señalización por auxinas localizado aguas abajo de dicha hormona y cuyo efecto se atribuye a la regulación de la expresión de genes del ciclo celular (Fang et al., 2014). Una investigación muy reciente aborda, en cambio, el estudio del efecto inhibitor del H₂S en el desarrollo radicular desde un punto de vista molecular. Este trabajo ha demostrado que el H₂S altera el patrón de respuesta a auxinas, lo que modifica la arquitectura radicular. Este efecto del H₂S es consecuencia de la inducción de genes *ABP* (“Actin Binding Proteins”) que desestabilizan los filamentos de actina del citoesqueleto, lo que repercute en el transporte polar de las auxinas en las células del meristemo radicular (Jia et al., 2015). En nuestro laboratorio hemos obtenido resultados similares mediante el estudio de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan el promotor sintético de respuesta a auxinas DR5 fusionado con el gen reportero GUS (Ulmasov et al., 1997; Shin et al., 2005). Nuestros datos ponen de manifiesto el efecto inhibitor del sulfuro sobre la distribución y la acumulación de las auxinas en el tejido foliar (resultados no publicados).

La identificación de elementos de respuesta a ácido abscísico (ABA) en el promotor de *DES1* y la detección de la fluorescencia de GFP en el citoplasma de las células guarda, apuntan a una posible función de la proteína DES1 o del sulfuro en estas células especializadas en las que se sabe que el ABA desempeña un importante papel. El sulfuro ya había sido relacionado con la regulación de procesos como el movimiento estomático (García-Mata and Lamattina, 2010; Lisjak et al., 2010) y recientemente se ha demostrado la implicación del sulfuro generado por DES1 en el cierre estomático dependiente de ABA (Scuffi et al., 2014). En este trabajo las plantas silvestres cierran los estomas en respuesta a la aplicación exógena de ABA, en cambio, los mutantes *des1* no responden al estímulo por ABA y no cierran sus estomas. Esta falta de respuesta a ABA en los mutantes es restaurada por complementación genética o por la adición de sulfuro. Además, existe una regulación transcripcional de *DES1*, específicamente en las células guarda, lo que demuestra de forma inequívoca la conexión entre ABA y DES1 (Scuffi et al., 2014). También se sabe que el ABA media la regulación de *OAS-A1* en respuesta al estrés salino (Barroso et al., 1999).

El promotor de *DES1* confiere también una fuerte expresión de GFP dentro de los tricomas, y este resultado apoya numerosos estudios que han demostrado la importancia del metabolismo del azufre en este tipo de células. Mediante la realización de ensayos de hibridación *in situ* junto con la determinación del contenido en glutatión por microscopía confocal, se demostró que la biosíntesis de glutatión es muy activa en los tricomas de *Arabidopsis* (Gotor et al., 1997; Gutierrez-Alcala et al., 2000). Además, en el perfil proteico realizado en este tipo específico de

célula también se identificó un importante número de proteínas implicadas en el metabolismo del azufre (Wienkoop et al., 2004). Esta expresión en los tricomas dirigido por el promotor de *DES1* es similar a la expresión dirigida por el promotor de la *OAS-A1* (Gutierrez-Alcala et al., 2005). Estos hallazgos sugieren que, en los tricomas, la homeostasis de la cisteína es importante y es modulada de forma coordinada por la acción de las enzimas OAS-A1 y DES1.

Aparte de los elementos en *cis* identificados en el promotor de *DES1* relacionados con la regulación por auxinas o ABA, han sido localizados otros elementos que se correlacionan con la respuesta a diferentes estreses y procesos relacionados con el desarrollo. Estos incluyen elementos de respuesta a sequía (DRE-like), elementos de respuesta a cambios en la osmolaridad celular (ATB2), y varias secuencias relacionadas con la respuesta a estrés biótico y estrés lumínico (MYB4) (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Chen et al., 2002; Satoh et al., 2004). El promotor de *DES1* también contiene numerosos elementos de respuesta a luz (LRE), así como elementos reguladores implicados en floración (LFY), y varios motivos RAV1, implicados en la maduración y la senescencia de la hoja (Terzaghi and Cashmore, 1995; Woo et al., 2010; Siriwardana and Lamb, 2012). La presencia de los elementos RAV1 en el promotor de *DES1* apoya tanto el fenotipo como los datos transcriptómicos de los mutantes *des1*, que sugieren que esta proteína juega un importante papel en las plantas maduras.

En los tejidos reproductivos, la expresión de GFP conferida por el promotor de *DES1* es detectada en las flores abiertas, principalmente en el pistilo, los sépalos, y los pétalos, a diferencia de los estambres, donde la señal GFP es más baja. La presencia del transcrito de *OAS-A1* también fue demostrada en las flores de *A. thaliana* en una investigación previa llevada a cabo por nuestro grupo mediante la técnica de hibridación *in situ* (Gotor et al., 1997).

Las zonas de abscisión presentes en las bases de las silicuas y en las semillas presentan una fuerte fluorescencia de GFP. La abscisión es un proceso regulado por hormonas como el etileno, el ácido jasmónico (JA) y el ABA. Las auxinas también participan en muchos eventos de abscisión (Basu et al., 2013).

En conclusión, el patrón de expresión tisular de GFP conferido por el promotor de *DES1* apoya la regulación hormonal de *DES1* y la existencia de una red de interconexión entre diferentes hormonas y la molécula de sulfuro actuando como molécula señalizadora.

En la segunda parte de esta Tesis Doctoral hemos abordado el efecto regulador del sulfuro en la autofagia. Hemos aportado nuevos datos experimentales que, junto a los previamente obtenidos en nuestro laboratorio, demuestran el papel del sulfuro en la regulación de la progresión de la autofagia, independientemente de la condición que la origine. Nuestros resultados contribuyen a comprender el mecanismo mediante el cual el sulfuro actúa regulando este proceso en plantas, al confirmar que su función no depende de su capacidad antioxidante.

Como se ha mencionado anteriormente, el papel del sulfuro en sistemas animales y vegetales ha cambiado drásticamente en los últimos años. Actualmente, el sulfuro no es solo

considerado una molécula tóxica para la vida, sino que también se ha establecido como un regulador de procesos biológicos esenciales. En mamíferos, el sulfuro se considera un nuevo gasotransmisor con diferentes funciones fisiológicas (Gadalla and Snyder, 2010). La alteración del metabolismo del sulfuro tiene importantes consecuencias patológicas, lo que pone de manifiesto la relevancia clínica de esta molécula (Łowicka and Beltowski, 2006; Szabó, 2007; Wang, 2012). En plantas, el sulfuro posee un efecto protector frente a una amplia variedad de estreses (Zhang et al., 2008; Wang et al., 2010; Zhang et al., 2010; Jin et al., 2011; Dawood et al., 2012; Li et al., 2012a; Li et al., 2012b; Cheng et al., 2013; Sun et al., 2013). Además, regula procesos cruciales para el desarrollo de las plantas, como la fotosíntesis (Chen et al., 2011), el movimiento estomático (Garcia-Mata and Lamattina, 2010; Lisjak et al., 2010; Scuffi et al., 2014) y la autofagia (Álvarez et al., 2012b; Gotor et al., 2013; Laureano-Marín et al., 2016).

La autofagia es un proceso constitutivo y las células vegetales, como ocurre en otros organismos, presentan unos niveles de autofagia basales en condiciones fisiológicas (Slavikova et al., 2005). Sin embargo, cuando las plantas se exponen a condiciones ambientales desfavorables, una de las respuestas para contrarrestar el estrés y poder sobrevivir es inducir la autofagia. La carencia de macronutrientes como el carbono o el nitrógeno es un ejemplo de estrés que comúnmente induce la autofagia en plantas, lo que suele ir acompañado de un incremento de los niveles de la proteína ATG8 (Doelling et al., 2002; Hanaoka et al., 2002; Xiong et al., 2005; Thompson et al., 2005b; Chung et al., 2009; Guiboileau et al., 2013). Esto coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio en el que hemos observado unos niveles basales de autofagia en raíces de plántulas de *Arabidopsis* que expresan la proteína de fusión GFP-ATG8a en condiciones de aporte suficiente de nitrógeno. Sin embargo, cuando las plántulas son transferidas a medios de cultivo en ausencia de nitrógeno, observamos una inducción de la autofagia. La autofagia se ha estudiado utilizando dos aproximaciones experimentales. Por un lado, mediante la detección de la fluorescencia de GFP asociada con los cuerpos autofágicos por microscopía confocal, con la posterior cuantificación de las vesículas marcadas; y por otro, mediante la inmuno-detección de los niveles de las distintas formas tanto de la proteína de fusión GFP-ATG8a como de la proteína ATG8 endógena en su forma libre y en su versión lipidada (ATG8-PE). La presencia de sulfuro durante el estrés nutricional evita la inducción de la autofagia, y mantiene unos niveles de autofagia similares a los que exhiben las raíces de plántulas cultivadas en un medio con suficiente nitrógeno. Además, hemos determinado la acumulación de la proteína GFP libre que se libera de la proteína de fusión cuando el cuerpo autofágico se transporta a la vacuola y que se correlaciona con el flujo autofágico, constituyendo otro marcador del proceso autofágico (Chung et al., 2010; Suttangkakul et al., 2011; Li et al., 2014). De esta forma observamos que la acumulación de GFP libre disminuye en presencia de sulfuro en el medio deficiente en nitrógeno y por tanto se demuestra una vez más una represión del flujo autofágico por esta molécula. El efecto del

sulfuro sobre la inducción de la autofagia no está relacionado con su disponibilidad como nutriente, ya que el medio de cultivo presenta una concentración suficiente de azufre en forma de sulfatos. La presencia de amonio a esa misma concentración tampoco afecta a la inducción de la autofagia. También, este efecto sobre la autofagia es específico de la molécula de sulfuro (tanto Na_2S como NaHS) ya que otros compuestos azufrados como sulfato o sulfito son incapaces de revertir la acumulación de los cuerpos autofágicos que se produce en condiciones de estrés nutricional de nitrógeno.

El impacto del sulfuro en la autofagia ya se había descrito previamente por nuestro grupo de investigación. Sin embargo, los efectos de esta molécula azufrada habían sido estudiados empleando un tejido diferente (hojas), de plantas en un estadio de desarrollo más avanzado (plantas maduras), donde la autofagia había sido inducida por una condición de estrés distinta (limitación de carbono) e incluso en un fondo genético diferente (mutante *desI*) (Álvarez et al., 2012b). Todos estos datos indican que la regulación de la autofagia por el sulfuro en sistemas vegetales es independiente del estadio de desarrollo, tejido y condición de estrés (al menos, el estrés nutricional), y que la regulación es a través de su acción represora. En mamíferos, el efecto del sulfuro en la autofagia no está claro, y existen estudios que han descrito un efecto supresor mientras que otros han demostrado lo contrario (Wang et al., 2012; Kundu et al., 2014). Recientemente, se ha puesto de manifiesto que los aminoácidos azufrados cisteína y metionina regulan la traducción proteica e inhiben la autofagia (Laxman et al., 2013; Sutter et al., 2013). En este último trabajo, la importancia es atribuida a la metionina que actúa como precursor del donador del grupo metilo, S-adenosil-metionina, el cual ha demostrado inhibir la autofagia mediante la acción de enzimas metiltransferasas, aunque la cisteína también ha demostrado suprimir la autofagia.

Descifrar el mecanismo que transforma la señal del sulfuro en una respuesta biológica e identificar sus dianas moleculares sigue siendo un reto. Estudios previos han demostrado que el sulfuro puede generar persulfuros de cisteína y glutatión que poseen propiedades antioxidantes superiores a la que presenta el glutatión. Los grupos persulfuros actúan como agentes reductores capaces de reaccionar rápidamente con moléculas electrófilas como el H_2O_2 (Francoleon et al., 2011; Ida et al., 2014). La relación existente entre la autofagia y las especies reactivas del oxígeno (ROS) se ha demostrado en estudios llevados a cabo en organismos fotosintéticos, donde se ha visto que la inducción de la autofagia se correlaciona con un aumento en la generación de ROS producida como consecuencia de algún estrés (Pérez-Pérez et al., 2012b). Nuestro objetivo era determinar si el mecanismo por el que el sulfuro reprime la autofagia está relacionado con la eliminación de ROS, como el H_2O_2 y el radical superóxido. Nuestros resultados muestran que el sulfuro es incapaz de eliminar las ROS generadas por la limitación de nitrógeno, lo que sí ocurre en presencia de glutatión reducido y ascorbato. Sin embargo, el tratamiento con estos compuestos antioxidantes no disminuyen los niveles de autofagia, a pesar

de su capacidad reductora. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el efecto del sulfuro en el progreso de la autofagia es independiente de su capacidad de reaccionar con el H_2O_2 o con el anión superóxido.

El segundo mecanismo propuesto para explicar el efecto fisiológico del sulfuro en sistemas animales es la modificación post-traducciona de proteínas conocida como S-sulfhidratación (Paul and Snyder, 2012). Esta modificación puede ser regulada por competición entre la nitrosilación y la sulfhidratación de los mismos residuos de cisteína. La S-sulfhidratación transforma un grupo $-SH$ en un $-SSH$, modificando la reactividad química y posiblemente el acceso de las enzimas a sus respectivas dianas, como se ha demostrado para la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Gadalla and Snyder, 2010; Kabil and Banerjee, 2010; Paul and Snyder, 2012). Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la S-sulfhidratación de las proteínas también tiene lugar en plantas de *Arabidopsis* cultivadas en ausencia de estrés, y se ha determinado por primera vez la presencia de un residuo de cisteína sulfhidratado en una proteína vegetal (Aroca et al., 2015). De estos resultados surgen dos cuestiones: si la S-sulfhidratación tiene un efecto regulador sobre la autofagia, y cuáles son las dianas implicadas en autofagia reguladas por el sulfuro.

Para responder a estas cuestiones, hemos profundizado en el estudio del mecanismo de acción del sulfuro y de sus posibles dianas moleculares en la regulación de la autofagia, como continuación del capítulo anterior. Nuestros resultados demuestran que una de las dos isoformas ATG4 presente en *A. thaliana* se S-sulfhidrata y que el sulfuro inhibe su actividad proteolítica. El efecto represor del sulfuro en la autofagia que observamos *in vivo* podría producirse, por tanto, a través de este mecanismo. Es la primera vez que se describe este tipo de modificación post-traducciona en una proteína ATG.

Basándonos en los resultados descritos que indican que el efecto represor del sulfuro en la autofagia no depende de la eliminación de las ROS generadas por la carencia de nitrógeno y, teniendo en cuenta que el segundo mecanismo propuesto de regulación es mediante la modificación post-traducciona de proteínas por S-sulfhidratación, nuestro objetivo ha sido determinar si el sulfuro modifica de esta forma a alguna proteína implicada en autofagia. Son varias las proteínas que participan en este proceso que contienen cisteínas reactivas en sus secuencias susceptibles de sufrir S-sulfhidratación. El estado redox de los tioles puede influir sustancialmente en la autofagia, especialmente durante las etapas iniciales y finales de la formación de los autofagosomas, debido a la capacidad de algunas proteínas ATG de percibir alteraciones de las condiciones redox de la célula a través de dichos residuos de cisteína reactivos (Filomeni et al., 2010). Los sistemas análogos a los de ubiquitina, ATG7-ATG10 y ATG7-ATG3, que participan en la elongación de la membrana y cuya función depende de un residuo de cisteína (Filomeni et al., 2010), son algunos de los ejemplos de proteínas ATG que podrían ser dianas de la S-sulfhidratación. Sin embargo, la única proteína ATG para la que se ha

demostrado una regulación redox es la cisteín proteasa ATG4. La proteína ATG4 procesa ATG8 por su extremo C-terminal dejando expuesto un residuo de glicina conservado para la posterior conjugación con el lípido PE, lo que en última instancia permite la adhesión de ATG8 a la membrana del autofagosoma. ATG4 también interviene en la desconjugación de ATG8-PE, liberando a ATG8 de la membrana del autofagosoma (Kirisako et al., 2000). Debido al papel dual que posee ATG4, su actividad debe estar muy regulada. En mamíferos se ha identificado un residuo de cisteína cercano al residuo catalítico que es crítico para la regulación redox de la proteína ATG4, la cual se encuentra inactiva en estado oxidado y activa cuando es reducida (Scherz-Shouval et al., 2007a). Además, un estudio realizado con la proteína ATG4 de levaduras ha revelado que su actividad está regulada por la oxido-reducción dependiente de tiorredoxina de un puente disulfuro establecido entre los residuos Cys³³⁸ y Cys³⁹⁴. La creación del puente disulfuro podría limitar la accesibilidad al sitio catalítico o interferir con la unión al sustrato inactivando, por tanto, a la proteína (Pérez-Pérez et al., 2014).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la isoforma ATG4a de *A. thaliana* se modifica por S-sulfhidratación *in vitro*. Para determinar si esta modificación post-traducciona tiene un efecto sobre la actividad de ATG4 hemos llevado a cabo un ensayo empleando como sustrato la proteína ATG8 de *Chlamydomonas reinhardtii* que, a diferencia de las isoformas ATG8 presentes en levaduras o *A. thaliana*, posee 15 residuos de aminoácidos a continuación de la glicina conservada. Esta característica de la proteína CrATG8 permite cuantificar y diferenciar la versión procesada de la proteína de la no procesada en un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie Blue, como ha sido descrito previamente (Pérez-Pérez et al., 2014). AtATG4a procesa correctamente la proteína ATG8 de *C. reinhardtii* y este procesamiento depende del tiempo de incubación y de la concentración de DTT necesarios para la correcta monomerización de AtATG4. Al realizar los ensayos de actividad detectamos la presencia de oligómeros de la proteína ATG4, como ya había sido puesto de manifiesto en un trabajo realizado con la proteasa de levaduras. La adopción de esta conformación por parte de la proteína ATG4 puede ser consecuencia del método de purificación, aunque no puede descartarse que posea una determinada función *in vivo* en algunas condiciones (Pérez-Pérez et al., 2014). Para que la proteasa sea activa debe encontrarse en su estado monomérico y para ello es necesaria la presencia de DTT reducido a una concentración apropiada. AtATG4a precisa de una mayor concentración de DTT para alcanzar su estado monomérico que la necesaria para obtener el mismo resultado en ScATG4. Esto puede indicar que la proteasa vegetal es menos susceptible de alcanzar el estado monomérico si se compara con la de levaduras.

Para determinar si el sulfuro puede participar, de forma análoga al DTT, en la promoción de la monomerización de la proteína ATG4, realizamos un estudio del efecto de la concentración de la molécula donadora de sulfuro, NaHS, sobre el estado de agregación de la proteína AtATG4a en ausencia de DTT. Los resultados revelan que, al menos en las

concentraciones ensayadas, el sulfuro no participa en la monomerización de AtATG4a necesaria para su posterior activación.

El siguiente objetivo ha sido demostrar si el sulfuro puede activar la actividad proteolítica de AtATG4a partiendo de una situación donde la proteína se encuentra en su conformación monomérica debido a la previa incubación con DTT reducido. Los resultados obtenidos no muestran ningún efecto sobre la actividad de ATG4, lo que nos llevó a pensar en la posibilidad de un efecto represor del sulfuro sobre la capacidad proteolítica de ATG4. En unas condiciones donde la proteasa se encuentra en su forma reducida y activa, la incubación en presencia de NaHS provoca una disminución de la cantidad de proteína CrATG8 procesada por AtATG4a. El tratamiento posterior con DTT revierte esta inhibición y produce un incremento del procesamiento, con una mayor acumulación de la versión procesada de CrATG8. Esto significa que el sulfuro puede sulfhidratar a ATG4 reprimiendo su actividad. Esta regulación negativa es reversible, ya que el DTT, además de activar por reducción a la proteína, puede revertir la sulfhidratación y por tanto su efecto inhibitorio.

En mamíferos y levaduras se asume que, de las dos actividades presentes en ATG4, la que es regulada por un mecanismo redox es la actividad delipidante (Nair et al., 2012; Nakatogawa et al., 2012; Yu et al., 2012; Pérez-Pérez et al., 2014). Nosotros proponemos un nuevo nivel de regulación que afectaría a la actividad proteolítica de ATG4 sobre las formas inmaduras de las proteínas ATG8, y que sería independiente de ROS. La inhibición de esta actividad por la sulfhidratación mediada por sulfuro se traduce en una disminución en el número de autofagosomas generados con la consiguiente inhibición parcial del proceso de autofagia (Figura 15). Como ocurre con otras modificaciones post-traduccionales con funciones reguladoras, los niveles de S-sulfhidratación deben estar enzimáticamente controlados en lo que a producción y eliminación se refiere. En mamíferos se ha demostrado que la tiorredoxina puede actuar como una depersulfidasa regulando negativamente los niveles de sulfhidratación de las proteínas (Wedmann et al., 2016). Además, como ha sido mencionado anteriormente, en levaduras la tiorredoxina participa en la activación de la proteína ATG4 mediante la reducción de un puente disulfuro establecido entre dos residuos de cisteína regulatorios (Pérez-Pérez et al., 2014). Un análisis proteómico ha identificado a la tiorredoxina y a la tiorredoxina reductasa como proteínas asociadas a los autofagosomas (Dengjel et al., 2012). Por tanto, la tiorredoxina podría participar en la modulación de la actividad de la proteína ATG4 actuando como una depersulfidasa sobre los residuos sulfhidratados de esta.

Son necesarios ensayos adicionales para determinar qué residuo de cisteína, de los 12 presentes en la secuencia de AtATG4a, es el que sufre la modificación por S-sulfhidratación. Las dos isoformas ATG4 presentes en *A. thaliana* exhiben una regulación redox análoga a la descrita para sus ortólogos en mamíferos y levaduras aunque, a diferencia de estas últimas, no se ha identificado cuál es el residuo responsable de dicha regulación, ni tampoco si es más de

uno (Woo et al., 2014). La existencia de aminoácidos con carga positiva, como la histidina, cerca de un residuo de cisteína y la localización de ésta al inicio de una α -hélice favorecen la ionización del grupo tiol y la formación de un grupo tiolato. Para que la modificación por S-sulfhidratación se produzca, el residuo de cisteína diana debe encontrarse en forma de tiolato, lo que favorece la reacción con el H_2O_2 y su oxidación hasta ácido sulfénico que es la forma de la cisteína que reacciona con el sulfuro (Krishnan et al., 2011; Roos et al., 2013). Realizando un alineamiento con las secuencias de AtATG4a y la de su ortólogo en levaduras, el residuo de cisteína regulado por oxido-reducción en levaduras, Cys³³⁸, se corresponde con el residuo Cys³⁸⁸ de AtATG4a (Pérez-Pérez et al., 2014) y en ambas proteínas este residuo está flanqueado por una histidina que podría favorecer la ionización y la formación del anión tiolato. La única estructura tridimensional resuelta hasta la fecha es la de HsATG4B en la que tanto la cisteína catalítica, Cys⁷⁷, como la que es diana de la regulación redox, Cys⁸¹, se sitúan en el extremo N-terminal de una α -hélice, ambas en el mismo plano (Sugawara et al., 2005; Kumanomidou et al., 2006). La realización de un modelaje de la estructura 3D de la proteína de *Arabidopsis* aportaría una valiosa información de los entornos químicos que rodean a las cisteínas así como de la localización de éstas dentro de la estructura, lo que serviría para predecir posibles modificaciones de las que podrían ser diana.

La existencia de dos isoformas diferentes de ATG4 y nueve de ATG8 en el genoma de *A. thaliana* ha dificultado el estudio de las funciones específicas de cada una de estas proteínas en el proceso autofágico. Otro de los trabajos futuros encaminados a estudiar el efecto inhibitor del sulfuro en la autofagia *in vivo* podría valerse de una herramienta descrita recientemente por Woo et. al. En este trabajo se ha generado una batería completa de las isoformas ATG8 presentes en *A. thaliana* fusionadas a genes reporteros como la luciferasa y la citrina fluorescente que permite la determinación de la actividad ATG4 *in vitro* e *in vivo* (Woo et al., 2014). Estas versiones modificadas de las proteínas ATG8 podrían emplearse para determinar el efecto del sulfuro sobre el procesamiento de cada una de ellas por cada una de las dos isoformas ATG4.

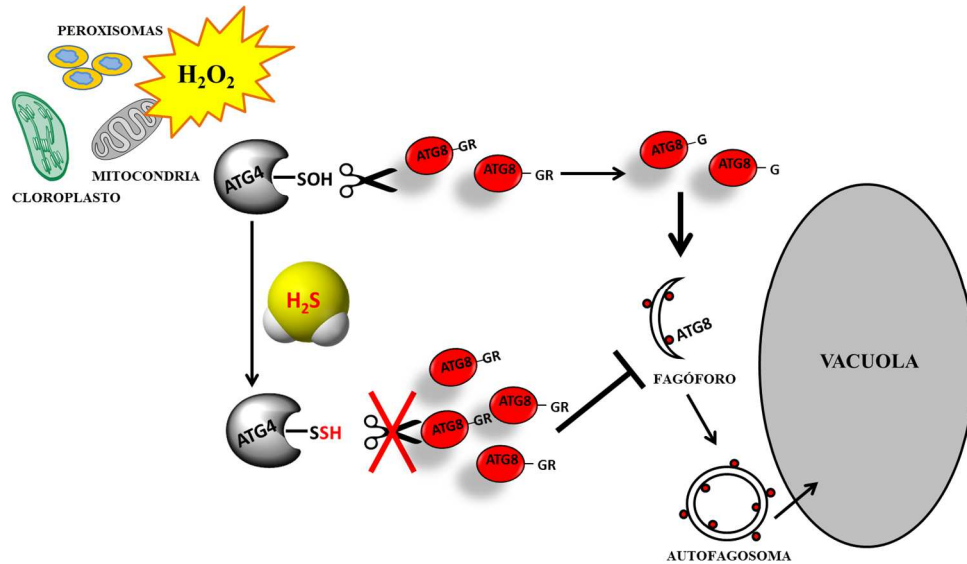


Figura 15: Modelo propuesto de regulación de la autofagia por S-sulfhidratación de ATG4 en *A. thaliana*. En presencia de H_2O_2 la proteasa ATG4 está activa y procesa a ATG8 por su extremo C-terminal eliminando los aminoácidos posteriores (R) al residuo de glicina conservado (G), lo que permite que ATG8 sea lipídado y se ancle a la membrana del autofagosoma, evento crucial para la progresión de la autofagia. La oxidación del grupo tiol de la cisteína por parte del H_2O_2 provoca la formación de ácido sulfénico ($-SOH$). El sulfuro reacciona con el ácido sulfénico produciendo un grupo persulfuro ($-SSH$) y S-sulfhidratando de esta forma a ATG4. La S-sulfhidratación de ATG4 reprime el procesamiento de ATG8 e inhibe parcialmente la formación de autofagosomas.

Conclusiones

1. *DES1* se expresa en todos los estadios del desarrollo de la planta, aunque su expresión es mayor durante las etapas iniciales y finales del crecimiento.
2. La expresión de la GFP dirigida por el promotor de *DES1* es muy ubicua. En fases tempranas del crecimiento se localiza en las raíces y en toda la hoja, en las células del mesófilo, la epidermis, los estomas y los tricomas. En la madurez se localiza también en los órganos reproductores.
3. El promotor de *DES1* contiene elementos en *cis* relacionados con una regulación hormonal de su expresión.
4. El sulfuro reprime la autofagia originada por privación de nitrógeno en raíces de *A. thaliana* y su efecto es dependiente de la dosis e independiente de su papel como nutriente.
5. El mecanismo por el que el sulfuro reprime la autofagia es independiente de sus propiedades antioxidantes.
6. Existe una correlación inversa entre el establecimiento de una condición de estrés como la carencia de nitrógeno y la expresión de *DES1*.
7. El efecto beneficioso del sulfuro sobre las plantas sometidas a privación de nitrógeno es visible a nivel fenotípico.
8. *In vitro*, la cisteína proteasa implicada en autofagia, ATG4, de *A. thaliana* se modifica post-traduccionalmente por S-sulfhidratación.
9. El sulfuro no participa en la monomerización de ATG4 ni tampoco en la inducción de su actividad proteolítica.
10. El sulfuro inhibe la actividad proteolítica de ATG4 sobre ATG8 *in vitro*.

Bibliografía

- Abe K y Kimura H** (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of neuroscience* **16**: 1066-1071
- Álvarez C, Bermudez MA, Romero LC, Gotor C y García I** (2012a) Cysteine homeostasis plays an essential role in plant immunity. *New Phytol* **193**: 165-177
- Álvarez C, Calo L, Romero LC, García I y Gotor C** (2010) An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 656-669
- Álvarez C, García I, Moreno I, Perez-Perez ME, Crespo JL, Romero LC y Gotor C** (2012b) Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 4621-4634
- Álvarez C, García I, Romero LC y Gotor C** (2012c) Mitochondrial sulfide detoxification requires a functional isoform O-acetylserine (thiol) lyase C in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant* **5**: 1217-1226
- Aroca A, Serna A, Gotor C y Romero L, C.** (2015) S-sulfhydration: a cysteine posttranslational modification in plant systems. *Plant Physiology* **168**: 334-342
- Avin-Wittenberg T, Honig A y Galili G** (2012) Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* **249**: 285-299
- Barr LA y Calvert JW** (2014) Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic. *Circ J* **78**: 2111-2118
- Barroso C, Romero LC, Cejudo FJ, Vega JM y Gotor C** (1999) Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene from Arabidopsis thaliana is dependent on abscisic acid. *Plant Mol Biol* **40**: 729-736
- Barroso C, Romero, L. C., Vega, J. M. y Gotor, C.** (1997) Molecular characterization of the sulfur metabolism in plants. *Current Topics Phytochem.* **1**: 19-29
- Barroso C, Vega JM y Gotor C** (1995) A new member of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene family in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* **363**: 1-5
- Basu MM, González-Carranza ZH, Azam-Ali S, Tang S, Shahid AA y Roberts JA** (2013) The manipulation of auxin in the abscission zone cells of Arabidopsis flowers reveals that indoleacetic acid signaling is a prerequisite for organ shedding. *Plant Physiology* **162**: 96-106
- Bassham DC** (2007) Plant autophagy--more than a starvation response. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 587-593
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ y Yoshimoto K** (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2**: 2-11
- Bednarek P, Piślewska-Bednarek M, Svatoš A, Schneider B, Doubský J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R y Sanchez-Vallet A** (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* **323**: 101-106
- Bermudez MA, Galmes J, Moreno I, Mullineaux PM, Gotor C y Romero LC** (2012) Photosynthetic adaptation to length of day is dependent on S-sulfocysteine synthase activity in the thylakoid lumen. *Plant Physiol* **160**: 274-288
- Bermúdez MA, Páez-Ochoa MA, Gotor C y Romero LC** (2010) Arabidopsis S-Sulfocysteine Synthase Activity Is Essential for Chloroplast Function and Long-Day Light-Dependent Redox Control. *The Plant Cell Online* **22**: 403-416
- Bleecker AB y Kende H** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual review of cell and developmental biology* **16**: 1-18

- Bloem E, Haneklaus S, Kesselmeier J y Schnug E** (2012) Sulfur Fertilization and Fungal Infections Affect the Exchange of H₂S and COS from Agricultural Crops. *J Agric Food Chem* **60**: 7588-7596
- Bloem E, Haneklaus S, Salac I, Wickenhäuser P y Schnug E** (2007) Facts and Fiction about Sulfur Metabolism in Relation to Plant-Pathogen Interactions. *Plant Biology* **9**: 596-607
- Bloem E, Riemenschneider A, Volker J, Papenbrock J, Schmidt A, Salac I, Haneklaus S y Schnug E** (2004) Sulphur supply and infection with *Pyrenopeziza brassicae* influence L-cysteine desulphydrase activity in *Brassica napus* L. *J Exp Bot* **55**: 2305-2312
- Bloem E, Rubekin K, Haneklaus S, Banfalvi Z, Hesse H y Schnug E** (2011) H₂S and COS Gas Exchange of Transgenic Potato Lines with Modified Expression Levels of Enzymes Involved in Sulphur Metabolism. *Journal of Agronomy and Crop Science* **197**: 311-321
- Bolchi A, Petrucco S, Tenca PL, Foroni C y Ottonello S** (1999) Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNAs in response to variations in sulfur nutritional status: stereospecific down-regulation by L-cysteine. *Plant Mol Biol* **39**: 527-537
- Bonner ER, Cahoon RE, Knapke SM y Jez JM** (2005) Molecular basis of cysteine biosynthesis in plants: structural and functional analysis of O-acetylserine sulphydrase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **280**: 38803-38813
- Buchanan BB y Balmer Y** (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 187-220
- Calderwood A y Kopriva S** (2014) Hydrogen sulfide in plants: From dissipation of excess sulfur to signaling molecule. *Nitric Oxide*
- Cao MJ, Wang Z, Wirtz M, Hell R, Oliver DJ y Xiang CB** (2013) SULTR3;1 is a chloroplast-localized sulfate transporter in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **73**: 607-616
- Cardenas ME, Cutler NS, Lorenz MC, Di Como CJ y Heitman J** (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes & development* **13**: 3271-3279
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H-S, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G y Whitham SA** (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**: 559-574
- Cheng W, Zhang L, Jiao C, Su M, Yang T, Zhou L, Peng R, Wang R y Wang C** (2013) Hydrogen sulfide alleviates hypoxia-induced root tip death in *Pisum sativum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **70**: 278-286
- Codogno P** (2004) [ATG genes and macroautophagy]. *Med Sci (Paris)*. 2004 Aug-Sep;20(8-9):734-6.
- Contento AL, Xiong Y y Bassham DC** (2005) Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J* **42**: 598-608
- Czyzewski BK y Wang DN** (2012) Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* **483**: 494-497
- Chaerle L, Saibo N y Van Der Straeten D** (2005) Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends Biotechnol* **23**: 308-315
- Chan T-F, Bertram PG, Ai W y Zheng XS** (2001) Regulation of APG14 expression by the GATA-type transcription factor Gln3p. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 6463-6467

- Chan Z y Shi H** (2015) Improved abiotic stress tolerance of bermudagrass by exogenous small molecules. *Plant Signal Behav* **10**: 991577
- Chen J, Wu FH, Wang WH, Zheng CJ, Lin GH, Dong XJ, He JX, Pei ZM y Zheng HL** (2011) Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *J Exp Bot* **62**: 4481-4493
- Chen Y, Azad M y Gibson S** (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death & Differentiation* **16**: 1040-1052
- Chung T, Phillips AR y Vierstra RD** (2010) ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A AND ATG12B loci. *Plant J* **62**: 483-493
- Chung T, Suttangkakul A y Vierstra RD** (2009) The ATG autophagic conjugation system in maize: ATG transcripts and abundance of the ATG8-lipid adduct are regulated by development and nutrient availability. *Plant Physiol* **149**: 220-234
- Davidian JC y Kopriva S** (2010) Regulation of sulfate uptake and assimilation--the same or not the same? *Mol Plant* **3**: 314-325
- Dawood M, Cao F, Jahangir MM, Zhang G y Wu F** (2012) Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley. *J Hazard Mater* **209-210**: 121-128
- Deng J, Lei C, Chen Y, Fang Z, Yang Q, Zhang H, Cai M, Shi L, Dong H y Xiong L** (2014) Neuroprotective gases – Fantasy or reality for clinical use? *Progress in Neurobiology* **115**: 210-245
- Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M, Bedu M, Robaglia C y Meyer C** (2007) The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO reports* **8**: 864-870
- Díaz-Troya S, Pérez-Pérez ME, Florencio FJ y Crespo JL** (2008) The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* **4**: 851-865
- Dixon DP, Laphorn A y Edwards R** (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biol* **3**: 3004.3001-3004.3010
- Dobrenel T, Marchive C, Azzopardi M, Clement G, Moreau M, Sormani R, Robaglia C y Meyer C** (2013) Sugar metabolism and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR? *Front Plant Sci* **4**
- Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR y Vierstra RD** (2002) The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **277**: 33105-33114
- Dooley FD, Nair SP y Ward PD** (2013) Increased Growth and Germination Success in Plants following Hydrogen Sulfide Administration. *PLoS One* **8**: e62048
- Dorman DC, Moulin FJ, McManus BE, Mahle KC, James RA y Struve MF** (2002) Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. *Toxicol Sci* **65**: 18-25
- Droux M** (2003) Plant serine acetyltransferase: new insights for regulation of sulphur metabolism in plant cells. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 619-627
- Droux M, Ruffet ML, Douce R y Job D** (1998) Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants--structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *Eur J Biochem* **255**: 235-245

- Falkenberg B, Witt I, Zanon MI, Steinhauser D, Mueller-Roeber B, Hesse H y Hoefgen R** (2008) Transcription factors relevant to auxin signalling coordinate broad-spectrum metabolic shifts including sulphur metabolism. *J Exp Bot* **59**: 2831-2846
- Fang T, Cao Z, Li J, Shen W y Huang L** (2014) Auxin-induced hydrogen sulfide generation is involved in lateral root formation in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* **76**: 44-51
- Ferreira-Silva SL, Voigt EL, Silva EN, Maia JM, Aragão TCR y Silveira JAG** (2011) Partial oxidative protection by enzymatic and non-enzymatic components in cashew leaves under high salinity. *Biologia Plantarum*: 1-5
- Filomeni G, Desideri E, Cardaci S, Rotilio G y Ciriolo MR** (2010) Under the ROS: Thiol network is the principal suspect for autophagy commitment. *Autophagy* **6**: 999-1005
- Foyer CH y Noctor G** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling* **11**: 861-905
- Foyer CH y Noctor G** (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**: 2-18
- Fujiki Y, Yoshimoto K y Ohsumi Y** (2007) An Arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiology* **143**: 1132-1139
- Fujiki Y, Yoshimoto K y Ohsumi Y** (2007) An Arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiol* **143**: 1132-1139
- Gadalla MM y Snyder SH** (2010) Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J Neurochem* **113**: 14-26
- Garcia-Mata C y Lamattina L** (2010) Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytol* **188**: 977-984
- Garcia-Mata C y Lamattina L** (2013) Gasotransmitters are emerging as new guard cell signaling molecules and regulators of leaf gas exchange. *Plant Sci* **201-202**: 66-73
- García I, Castellano JM, Vioque B, Solano R, Gotor C y Romero LC** (2010) Mitochondrial beta-cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**: 3268-3279
- García I, Gotor C y Romero LC** (2014) Beyond toxicity: a regulatory role for mitochondrial cyanide. *Plant Signal Behav* **9**: 7
- García I, Gotor C y Romero LC** (2015) Cysteine Homeostasis. *In*. CABI Publishing
- García I, Rosas T, Bejarano ER, Gotor C y Romero LC** (2013) Transient transcriptional regulation of the CYS-C1 gene and cyanide accumulation upon pathogen infection in the plant immune response. *Plant Physiol* **162**: 2015-2027
- Gotor C, Álvarez C, Bermudez MA, Moreno I, García I y Romero LC** (2010) Low abundance does not mean less importance in cysteine metabolism. *Plant Signal Behav* **5**: 1028-1030
- Gotor C, Cejudo FJ, Barroso C y Vega JM** (1997) Tissue-specific expression of ATCYS-3A, a gene encoding the cytosolic isoform of O-acetylserine (thiol) lyase in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **11**: 347-352
- Gotor C, García I, Crespo JL y Romero LC** (2013) Sulfide as a signaling molecule in autophagy. *Autophagy* **9**: 609-611
- Gotor C, Laureano-Marin AM, Moreno I, Aroca A, García I y Romero LC** (2014) Signaling in the plant cytosol: cysteine or sulfide? *Amino Acids*
- Gotor C y Romero LC** (2013) S-sulfocysteine synthase function in sensing chloroplast redox status. *Plant Signal Behav* **8**: 18
- Guiboileau A, Avila-Ospina L, Yoshimoto K, Soulay F, Azzopardi M, Marmagne A, Lothier J y Masclaux-Daubresse C** (2013) Physiological and metabolic consequences

- of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in Arabidopsis leaves depending on nitrate availability. *New Phytologist* **199**: 683-694
- Guiboileau A, Sormani R, Meyer C y Masclaux-Daubresse C** (2010) Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *C R Biol* **333**: 382-391
- Gutierrez-Alcala G, Calo L, Gros F, Caissard JC, Gotor C y Romero LC** (2005) A versatile promoter for the expression of proteins in glandular and non-glandular trichomes from a variety of plants. *J Exp Bot* **56**: 2487-2494
- Gutierrez-Alcala G, Gotor C, Meyer AJ, Fricker M, Vega JM y Romero LC** (2000) Glutathione biosynthesis in Arabidopsis trichome cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11108-11113
- Gutierrez-Marcos JF, Roberts MA, Campbell EI y Wray JL** (1996) Three members of a novel small gene-family from Arabidopsis thaliana able to complement functionally an Escherichia coli mutant defective in PAPS reductase activity encode proteins with a thioredoxin-like domain and "APS reductase" activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13377-13382
- Haag AF, Kerscher B, Dall'Angelo S, Sani M, Longhi R, Baloban M, Wilson HM, Mergaert P, Zanda M y Ferguson GP** (2012) Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodule-specific, cysteine-rich peptide. *J Biol Chem* **287**: 10791-10798
- Haas FH, Heeg C, Queiroz R, Bauer A, Wirtz M y Hell R** (2008) Mitochondrial serine acetyltransferase functions as a pacemaker of cysteine synthesis in plant cells. *Plant Physiol* **148**: 1055-1067
- Han S, Yu B, Wang Y y Liu Y** (2011) Role of plant autophagy in stress response. *Protein & cell* **2**: 784-791
- Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S y Ohsumi Y** (2002) Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol* **129**: 1181-1193
- Hancock JT y Whiteman M** (2014) Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? *Plant Physiol Biochem* **78c**: 37-42
- Harding TM, Morano KA, Scott SV y Klionsky DJ** (1995) Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *The Journal of cell biology* **131**: 591-602
- Harrison-Lowe NJ y Olsen LJ** (2008) Autophagy protein 6 (ATG6) is required for pollen germination in Arabidopsis thaliana. *Autophagy* **4**: 339-348
- Hatzfeld Y, Lee S, Lee M, Leustek T y Saito K** (2000) Functional characterization of a gene encoding a fourth ATP sulfurylase isoform from Arabidopsis thaliana. *Gene* **248**: 51-58
- Hayward AP, Tsao J y Dinesh-Kumar SP** (2009) Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 1041-1047
- He C y Klionsky DJ** (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics* **43**: 67
- Heeg C, Kruse C, Jost R, Gutensohn M, Ruppert T, Wirtz M y Hell R** (2008) Analysis of the Arabidopsis O-acetylserine(thiol)lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis. *Plant Cell* **20**: 168-185
- Heidenreich T, Wollers S, Mendel RR y Bittner F** (2005) Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from Arabidopsis thaliana provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *J Biol Chem* **280**: 4213-4218

- Hetherington AM y Woodward FI** (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**: 901-908
- Hirai MY, Fujiwara T, Awazuwara M, Kimura T, Noji M y Saito K** (2003) Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal* **33**: 651-663
- Hofius D, Schultz-Larsen T, Joensen J, Tsitsigiannis DI, Petersen NH, Mattsson O, Jorgensen LB, Jones JD, Mundy J y Petersen M** (2009) Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell* **137**: 773-783
- Hou K, Wu W y Gan S-S** (2013) SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **161**: 1002-1009
- Howarth JR, Dominguez-Solis JR, Gutierrez-Alcala G, Wray JL, Romero LC y Gotor C** (2003) The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. *Plant Mol Biol* **51**: 589-598
- Hu LY, Hu SL, Wu J, Li YH, Zheng JL, Wei ZJ, Liu J, Wang HL, Liu YS y Zhang H** (2012) Hydrogen sulfide prolongs postharvest shelf life of strawberry and plays an antioxidative role in fruits. *J Agric Food Chem* **60**: 8684-8693
- Huihui F, Yanxi P, Baohua T, Liping Z, Zengjie Q y Zhiqiang L** (2014) Ca²⁺ Participates in H₂S Induced Cr⁶⁺ Tolerance in *Setaria italica*. *Chinese Journal of Cell Biology* **6**: 008
- Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM y Akaike T** (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 7606-7611
- Inoue Y, Suzuki T, Hattori M, Yoshimoto K, Ohsumi Y y Moriyasu Y** (2006) AtATG Genes, Homologs of Yeast Autophagy Genes, are Involved in Constitutive Autophagy in *Arabidopsis* Root Tip Cells. *Plant and cell physiology* **47**: 1641-1652
- Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR y Mae T** (2008) Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol* **148**: 142-155
- Jez JM y Dey S** (2013) The cysteine regulatory complex from plants and microbes: what was old is new again. *Curr Opin Struct Biol* **23**: 302-310
- Jia H, Hu Y, Fan T y Li J** (2015) Hydrogen sulfide modulates actin-dependent auxin transport via regulating ABPs results in changing of root development in *Arabidopsis*. *Scientific reports* **5**
- Jin Z, Shen J, Qiao Z, Yang G, Wang R y Pei Y** (2011) Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* **414**: 481-486
- Jin Z, Xue S, Luo Y, Tian B, Fang H, Li H y Pei Y** (2013) Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **62**: 41-46
- Joshi MM, Ibrahim AIK y Hollis JP** (1975) Hydrogen sulphide: effects on the physiology of rice plants and relation to straighthead disease. *Phytopathology* **65**: 1165-1170
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y y Yoshimori T** (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* **19**: 5720-5728

- Kabil O y Banerjee R** (2010) Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J Biol Chem* **285**: 21903-21907
- Kabil O, Motl N y Banerjee R** (2014) H₂S and its role in redox signaling. *Biochim Biophys Acta* **1844**: 1355-1366
- Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H y Niki I** (2006) L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic β -cell possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes* **55**: 1391-1397
- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T y Takahashi H** (2004) Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2693-2704
- Katsiarimpa A, Kalinowska K, Anzenberger F, Weis C, Ostertag M, Tsutsumi C, Schwechheimer C, Brunner F, Huckelhoven R y Isono E** (2013) The deubiquitinating enzyme AMSH1 and the ESCRT-III subunit VPS2.1 are required for autophagic degradation in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 2236-2252
- Kawashima CG, Berkowitz O, Hell R, Noji M y Saito K** (2005) Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulfur assimilation pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* **137**: 220-230
- Ketelaar T, Voss C, Dimmock SA, Thumm M y Hussey PJ** (2004) Arabidopsis homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Lett* **567**: 302-306
- Khan MS, Haas FH, Samami AA, Gholami AM, Bauer A, Fellenberg K, Reichelt M, Hansch R, Mendel RR, Meyer AJ, Wirtz M y Hell R** (2010) Sulfite reductase defines a newly discovered bottleneck for assimilatory sulfate reduction and is essential for growth and development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**: 1216-1231
- Kida K, Yamada M, Tokuda K, Marutani E, Kakinohana M, Kaneki M y Ichinose F** (2011) Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling* **15**: 343-352
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S y Lemasters JJ** (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**: 245-253
- Kimura Y y Kimura H** (2004) Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB journal* **18**: 1165-1167
- Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T y Ohsumi Y** (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *The Journal of cell biology* **147**: 435-446
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T y Ohsumi Y** (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* **151**: 263-276
- Kiššová I, Deffieu M, Samokhvalov V, Velours G, Bessoule J-J, Manon S y Camougrand N** (2006) Lipid oxidation and autophagy in yeast. *Free Radical Biology and Medicine* **41**: 1655-1661
- Kliebenstein D** (2004) Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through Arabidopsis thaliana tinted glasses. *Plant Cell Environ* **27**: 675-684
- Kolluru GK, Shen X, Bir SC y Kevil CG** (2013) Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* **35**: 5-20

- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC y Pieterse CM** (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* **147**: 1358-1368
- Kopriva S y Koprivova A** (2004) Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *J Exp Bot* **55**: 1775-1783
- Krishnan N, Fu C, Pappin DJ y Tonks NK** (2011) H₂S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci Signal* **4**: ra86
- Krueger S, Niehl A, Martin MC, Steinhauser D, Donath A, Hildebrandt T, Romero LC, Hoefgen R, Gotor C y Hesse H** (2009) Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment* **32**: 349-367
- Kulich I, Pecenkova T, Sekeres J, Smetana O, Fendrych M, Foissner I, Hoftberger M y Zarsky V** (2013) Arabidopsis exocyst subcomplex containing subunit EXO70B1 is involved in autophagy-related transport to the vacuole. *Traffic* **14**: 1155-1165
- Kundu S, Pushpakumar S, Khundmiri SJ y Sen U** (2014) Hydrogen sulfide mitigates hyperglycemic remodeling via liver kinase B1-adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1843**: 2816-2826
- Kushnir S, Babiychuk E, Storozhenko S, Davey MW, Papenbrock J, De Rycke R, Engler G, Stephan UW, Lange H, Kispal G, Lill R y Van Montagu M** (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter Stal leads to dwarfism and chlorosis in the Arabidopsis mutant starik. *Plant Cell* **13**: 89-100
- Lai Z, Wang F, Zheng Z, Fan B y Chen Z** (2011) A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J* **66**: 953-968
- Laplanche M y Sabatini DM** (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**: 274-293
- Laureano-Marín AM, Garcia I, Romero LC y Gotor C** (2014) Assessing the transcriptional regulation of L-cysteine desulfhydrase 1 in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci* **5**: 683
- Laureano-Marín AM, Moreno I, Romero LC y Gotor C** (2016) Negative regulation of autophagy by sulfide in Arabidopsis thaliana is independent of reactive oxygen species. *Plant Physiology*: pp. 00110.02016
- Laxman S, Sutter BM, Wu X, Kumar S, Guo X, Trudgian DC, Mirzaei H y Tu BP** (2013) Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation. *Cell* **154**: 416-429
- Le Bars R, Marion J, Le Borgne R, Satiat-Jeunemaitre B y Bianchi MW** (2014) ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants. *Nat Commun* **5**
- Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW y Finkel T** (2008) A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 3374-3379
- Lee IH y Finkel T** (2009) Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 6322-6328
- Lee Y, Kim E-S, Choi Y, Hwang I, Staiger CJ, Chung Y-Y y Lee Y** (2008) The Arabidopsis phosphatidylinositol 3-kinase is important for pollen development. *Plant Physiology* **147**: 1886-1897

- Lenz HD, Haller E, Melzer E, Kober K, Wurster K, Stahl M, Bassham DC, Vierstra RD, Parker JE, Bautor J, Molina A, Escudero V, Shindo T, van der Hoorn RA, Gust AA y Nurnberger T** (2011) Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant J* **66**: 818-830
- León J, Romero LC, Galván F y Vega J** (1987) Purification and physicochemical characterization of O-acetyl-l-serine sulfhydrylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* **53**: 93-99
- Leon S, Touraine B, Briat JF y Lobreaux S** (2002) The AtNFS2 gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. *Biochem J* **366**: 557-564
- Leshem Y, Seri L y Levine A** (2007) Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *The Plant Journal* **51**: 185-197
- Li F, Chung T y Vierstra RD** (2014) AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 788-807
- Li F y Vierstra RD** (2012) Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci* **17**: 526-537
- Li F y Vierstra RD** (2014) *Arabidopsis* ATG11, a scaffold that links the ATG1-ATG13 kinase complex to general autophagy and selective mitophagy. *Autophagy* **10**: 1466-1467
- Li J, Jia H, Wang J, Cao Q y Wen Z** (2013) Hydrogen sulfide is involved in maintaining ion homeostasis via regulating plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter system in the hydrogen peroxide-dependent manner in salt-stress *Arabidopsis thaliana* root. *Protoplasma* **251**: 899-912
- Li L, Wang Y y Shen W** (2012a) Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. *Biometals* **25**: 617-631
- Li Q y Lancaster JR, Jr.** (2013) Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide* **35**: 21-34
- Li Z-G, Gong M y Liu P** (2012) Hydrogen sulfide is a mediator in H₂O₂-induced seed germination in *Jatropha Curcas*. *Acta Physiologiae Plantarum* **34**: 2207-2213
- Li ZG, Ding XJ y Du PF** (2013) Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-improved heat tolerance in maize and involvement of proline. *J Plant Physiol* **170**: 741-747
- Li ZG, Gong M, Xie H, Yang L y Li J** (2012) Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) suspension cultured cells and involvement of Ca(2+) and calmodulin. *Plant Sci* **186**: 185-189
- Lim PO, Lee IC, Kim J, Kim HJ, Ryu JS, Woo HR y Nam HG** (2010) Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J Exp Bot*: erq010
- Lin JF y Wu SH** (2004) Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* **39**: 612-628
- Lin Y-T, Li M-Y, Cui W-T, Lu W y Shen W-B** (2012) Haem Oxygenase-1 is Involved in Hydrogen Sulfide-induced Cucumber Adventitious Root Formation. *Journal of Plant Growth Regulation* **31**: 519-528
- Lisjak M, Srivastava N, Teklic T, Civale L, Lewandowski K, Wilson I, Wood ME, Whiteman M y Hancock JT** (2010) A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. *Plant Physiol Biochem* **48**: 931-935
- Lisjak M, Teklic T, Wilson ID, Whiteman M y Hancock JT** (2013) Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule? *Plant Cell Environ* **36**: 1607-1616

- Lisjak M, Teklic T, Wilson ID, Wood M, Whiteman M y Hancock JT** (2011) Hydrogen sulfide effects on stomatal apertures. *Plant Signal Behav* **6**: 1444-1446
- Liu Y y Bassham DC** (2010) TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **5**: e11883
- Liu Y y Bassham DC** (2012) Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 215-237
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallochy Z, Levine B y Dinesh-Kumar SP** (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* **121**: 567-577
- Liu Y, Xiong Y y Bassham DC** (2009) Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* **5**: 954-963
- López-Martín MC, Becana M, Romero LC y Gotor C** (2008) Knocking Out Cysteine Synthesis Compromises the Antioxidant Capacity of the Cytosol to Maintain Discrete Concentrations of Hydrogen Peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**: 562-572
- Lowicka E y Beltowski J** (2006) Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological reports: PR* **59**: 4-24
- Lv X, Pu X, Qin G, Zhu T y Lin H** (2014) The roles of autophagy in development and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Apoptosis* **19**: 905-921
- Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ y Verma DPS** (2006) *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* **18**: 477-490
- Mancardi D, Penna C, Merlino A, Del Soldato P, Wink DA y Pagliaro P** (2009) Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogen sulfide. *Biochim Biophys Acta* **7**: 864-872
- Mani S, Li H, Untereiner A, Wu L, Yang G, Austin RC, Dickhout JG, Lhoták Š, Meng QH y Wang R** (2013) Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation* **127**: 2523-2534
- Mann SS y Hammarback JA** (1994) Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem* **269**: 11492-11497
- Mari M, Griffith J, Rieter E, Krishnappa L, Klionsky DJ y Reggiori F** (2010) An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *J Cell Biol* **190**: 1005-1022
- Martelli A, Testai L, Breschi MC, Blandizzi C, Viridis A, Taddei S y Calderone V** (2012) Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery. *Med Res Rev* **32**: 1093-1130
- Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C y Robaglia C** (2002) Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 6422-6427
- Mendoza-Cozatl DG, Jobe TO, Hauser F y Schroeder JI** (2011) Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 554-562
- Miura K y Hasegawa PM** (2010) Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. *Trends in cell biology* **20**: 223-232
- Mizushima N** (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**: 2861-2873
- Morel A, Malinowska J y Olas B** (2014) Hydrogen sulfide changes adhesive properties of fibrinogen and collagen in vitro. *Platelets* **25**: 147-149
- Mugford SG, Lee BR, Koprivova A, Matthewman C y Kopriva S** (2011) Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism. *Plant J* **65**: 96-105

- Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R y Snyder SH** (2009) H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Sci. Signal.* **2**: ra72-
- Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R, Amzel LM, Berkowitz DE y Snyder SH** (2011) Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res* **109**: 1259-1268
- Nagai M, Ohnishi M, Uehara T, Yamagami M, Miura E, Kamakura M, Kitamura A, SAKAGUCHI SI, Sakamoto W y Shimmen T** (2013) Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant Cell Environ* **36**: 1826-1837
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG y Marton MJ** (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Molecular and cellular biology* **21**: 4347-4368
- Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, Gretzmeier C, Dengjel J, Piacentini M y Fimia GM** (2013) mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature cell biology* **15**: 406-416
- Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H y Hoefgen R** (2003) Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *The Plant Journal* **33**: 633-650
- Nishikawa H, Hayashi H, Kubo S, Tsubota-Matsunami M, Sekiguchi F y Kawabata A** (2013) Inhibition by hydrogen sulfide of rabbit platelet aggregation and calcium mobilization. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **36**: 1278-1282
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G y Foyer CH** (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ* **35**: 454-484
- Noji M, Inoue K, Kimura N, Gouda A y Saito K** (1998) Isoform-dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 32739-32745
- Ohashi Y y Munro S** (2010) Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system. *Molecular biology of the cell* **21**: 3998-4008
- Olas B** (2015) Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clin Chim Acta* **439**: 212-218
- Olas B y Kontek B** (2014) The possible role of hydrogen sulfide as a modulator of hemostatic parameters of plasma. *Chemico-biological interactions* **220**: 20-24
- Papenbrock J, Riemenschneider A, Kamp A, Schulz-Vogt HN y Schmidt A** (2007) Characterization of cysteine-degrading and H₂S-releasing enzymes of higher plants - from the field to the test tube and back. *Plant Biol* **9**: 582-588
- Park S y Imlay JA** (2003) High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *J Bacteriol* **185**: 1942-1950
- Patel S, Caplan J y Dinesh-Kumar SP** (2006) Autophagy in the control of programmed cell death. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 391-396
- Patel S y Dinesh-Kumar SP** (2008) *Arabidopsis* ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy* **4**: 20-27
- Paul BD y Snyder SH** (2012) H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 499-507

- Pérez-Martín M, Blaby-Haas CE, Pérez-Pérez ME, Andrés-Garrido A, Blaby IK, Merchant SS y Crespo JL** (2015) Activation of Autophagy by Metals in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell* **14**: 964-973
- Pérez-Martín M, Pérez-Pérez ME, Lemaire SD y Crespo JL** (2014) Oxidative stress contributes to autophagy induction in response to endoplasmic reticulum stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **166**: 997-1008
- Pérez-Pérez ME, Couso I y Crespo JL** (2012a) Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* **8**: 376-388
- Pérez-Pérez ME y Crespo JL** (2010b) Autophagy in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* **6**: 562-563
- Pérez-Pérez ME, Florencio FJ y Crespo JL** (2010a) Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **152**: 1874-1888
- Pérez-Pérez ME, Lemaire SD y Crespo JL** (2012b) Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiol* **160**: 156-164
- Pérez-Pérez ME, Zaffagnini M, Marchand CH, Crespo JL y Lemaire SD** (2014) The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy* **10**: 1953-1964
- Phillips AR, Suttangkakul A y Vierstra RD** (2008) The ATG12-conjugating enzyme ATG10 Is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **178**: 1339-1353
- Pilon-Smits EA, Garifullina GF, Abdel-Ghany S, Kato S, Mihara H, Hale KL, Burkhead JL, Esaki N, Kurihara T y Pilon M** (2002) Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. *Plant Physiol* **130**: 1309-1318
- Polhemus DJ y Lefer DJ** (2014) Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circulation research* **114**: 730-737
- Qiao W, Chaoshu T, Hongfang J y Junbao D** (2010) Endogenous hydrogen sulfide is involved in the pathogenesis of atherosclerosis. *Biochemical and biophysical research communications* **396**: 182-186
- Rea PA** (2012) Phytochelatin synthase: of a protease a peptide polymerase made. *Physiol Plant* **145**: 154-164
- Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE y Klionsky DJ** (2004) The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell* **6**: 79-90
- Rennenberg H, Arabatzis N y Grundel I** (1987) Cysteine desulphydrase activity in higher plants: Evidence for the action of L- and D-cysteine specific enzymes. *Phytochemistry* **26**: 1583-1589
- Riemenschneider A, Riedel K, Hoefgen R, Papenbrock J y Hesse H** (2005a) Impact of reduced O-acetylserine (thiol) lyase isoform contents on potato plant metabolism. *Plant Physiology* **137**: 892-900
- Riemenschneider A, Wegele R, Schmidt A y Papenbrock J** (2005b) Isolation and characterization of a D-cysteine desulphydrase protein from *Arabidopsis thaliana*. *Febs J* **272**: 1291-1304
- Robaglia C, Thomas M y Meyer C** (2012) Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 301-307
- Rohwerder T y Sand W** (2003) The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* **149**: 1699-1710

- Romero LC, Aroca MA, Laureano-Marin AM, Moreno I, Garcia I y Gotor C** (2014) Cysteine and cysteine-related signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **7**: 264-276
- Romero LC, Garcia I y Gotor C** (2013) L-Cysteine Desulfhydrase 1 modulates the generation of the signaling molecule sulfide in plant cytosol. *Plant Signal Behav* **8**: e24007
- Rotte C y Leustek T** (2000) Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5'-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of *Arabidopsis* leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions. *Plant Physiol* **124**: 715-724
- Santo-Domingo J y Demarex N** (2012) Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the renaissance of mitochondrial pH. *J Gen Physiol* **139**: 415-423
- Satoh R, Fujita Y, Nakashima K, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology* **45**: 309-317
- Scuffi D, Nunez A, Laspina N, Gotor C, Lamattina L y Garcia-Mata C** (2014) Hydrogen sulfide generated by L-cysteine desulfhydrase acts upstream of nitric oxide to modulate ABA-dependent stomatal closure. *Plant Physiol*
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L y Elazar Z** (2007a) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal* **26**: 1749-1760
- Schmidt A** (1982) *Z. Pflanzphysiol.* **107**: 301
- Schmidt A** (2005) Metabolic background of H₂S release from plants. *In* Proceedings of the 1st Sino-German Workshop on Aspects of Sulfur Nutrition of Plants. Landbauforschung Völknerode, Braunschweig, Germany, pp 121-129
- Schultzendubel A y Polle A** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* **53**: 1351-1365
- Sell S, Lindermayr C y Durner J** (2008) Identification of S-Nitrosylated Proteins in Plants. *Methods in enzymology* **440**: 283-293
- Shan C, Liu H, Zhao L y Wang X** (2013) Effects of exogenous hydrogen sulfide on the redox states of ascorbate and glutathione in maize leaves under salt stress. *Biologia Plantarum* **58**: 169-173
- Shen J, Xing T, Yuan H, Liu Z, Jin Z, Zhang L y Pei Y** (2013) Hydrogen Sulfide Improves Drought Tolerance in *Arabidopsis thaliana* by MicroRNA Expressions. *PLoS ONE* **8**: e77047
- Shi C-S y Kehrl JH** (2010) TRAF6 and A20 Regulate Lysine 63-Linked Ubiquitination of Beclin-1 to Control TLR4-Induced Autophagy. *Sci. Signal.* **3**: ra42-ra42
- Shibuya N y Kimura H** (2013) Production of hydrogen sulfide from D-cysteine and its therapeutic potential. *Frontiers in Endocrinology* **4**
- Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K y Kimura H** (2009) 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal* **11**: 703-714
- Shin H, Shin HS, Guo Z, Blancaflor EB, Masson PH y Chen R** (2005) Complex regulation of *Arabidopsis* AGR1/PIN2-mediated root gravitropic response and basipetal auxin transport by cantharidin-sensitive protein phosphatases. *The Plant Journal* **42**: 188-200

- Shin KD, Lee HN y Chung T** (2014) A revised assay for monitoring autophagic flux in *Arabidopsis thaliana* reveals involvement of AUTOPHAGY-RELATED9 in autophagy. *Mol Cells* **37**: 399-405
- Singh VP, Singh S, Kumar J y Prasad SM** (2015) Hydrogen sulfide alleviates toxic effects of arsenate in pea seedlings through up-regulation of the ascorbate-glutathione cycle: Possible involvement of nitric oxide. *J Plant Physiol* **181**: 20-29
- Siriwardana NS y Lamb RS** (2012) The poetry of reproduction: the role of LEAFY in *Arabidopsis thaliana* flower formation. *Int J Dev Biol* **56**: 207-221
- Slavikova S, Shy G, Yao Y, Glozman R, Levanony H, Pietrokovski S, Elazar Z y Galili G** (2005) The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis* plants. *J Exp Bot* **56**: 2839-2849
- Sormani R, Yao L, Menand B, Ennar N, Lecampion C, Meyer C y Robaglia C** (2007) *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC plant biology* **7**: 26
- Stack JH, Herman P, Schu P y Emr S** (1993) A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *The EMBO Journal* **12**: 2195
- Stephan JS, Yeh Y-Y, Ramachandran V, Deminoff SJ y Herman PK** (2009) The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 17049-17054
- Sun J, Wang R, Zhang X, Yu Y, Zhao R, Li Z y Chen S** (2013) Hydrogen sulfide alleviates cadmium toxicity through regulations of cadmium transport across the plasma and vacuolar membranes in *Populus euphratica* cells. *Plant Physiol Biochem* **65**: 67-74
- Sun W-H, Liu F, Chen Y y Zhu Y-C** (2012) Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. *Biochemical and biophysical research communications* **421**: 164-169
- Surpin M, Zheng H, Morita MT, Saito C, Avila E, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Kovaleva V, Carter D, Murphy A, Tasaka M y Raikhel N** (2003) The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. *Plant Cell* **15**: 2885-2899
- Suttangkakul A, Li F, Chung T y Vierstra RD** (2011) The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 3761-3779
- Sutter BM, Wu X, Laxman S y Tu BP** (2013) Methionine inhibits autophagy and promotes growth by inducing the SAM-responsive methylation of PP2A. *Cell* **154**: 403-415
- Szabó C** (2007) Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews Drug discovery* **6**: 917-935
- Takahashi H** (2010) Regulation of sulfate transport and assimilation in plants. *Int Rev Cell Mol Biol* **281**: 129-159
- Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, Saito K y Hell R** (2011) Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 157-184

- Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ y Saito K** (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **23**: 171-182
- Talaei F, van Praag VM y Henning RH** (2013) Hydrogen sulfide restores a normal morphological phenotype in Werner syndrome fibroblasts, attenuates oxidative damage and modulates mTOR pathway. *Pharmacol Res* **74**: 34-44
- Tan BH, Wong PT y Bian JS** (2010) Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the central nervous system. *Neurochem Int* **56**: 3-10
- Teale WD, Paponov IA y Palme K** (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 847-859
- Terzaghi WB y Cashmore AR** (1995) Light-regulated transcription. *Annual review of plant biology* **46**: 445-474
- Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A y Vierstra RD** (2005b) Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol* **138**: 2097-2110
- Thompson AR y Vierstra RD** (2005a) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 165-173
- Thompson CR y Kats G** (1978) Effects of continuous hydrogen sulfide fumigation on crop and forest plants. *Environmental Science & Technology* **12**: 550-553
- Toohey JI** (2011) Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane? *Anal Biochem* **413**: 1-7
- Tsukada M y Ohsumi Y** (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**: 169-174
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G y Guilfoyle TJ** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963-1971
- van Doorn WG y Papini A** (2013) Ultrastructure of autophagy in plant cells: a review. *Autophagy* **9**: 1922-1936
- Vauclare P, Kopriva S, Fell D, Suter M, Sticher L, von Ballmoos P, Krahenbuhl U, den Camp RO y Brunold C** (2002) Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *Plant J* **31**: 729-740
- Wagner CA** (2009) Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator. *J Nephrol* **22**: 173-176
- Wang BL, Shi L, Li YX y Zhang WH** (2010) Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Planta* **231**: 1301-1309
- Wang D, Ma Y, Li Z, Kang K, Sun X, Pan S, Wang J, Pan H, Liu L, Liang D y Jiang H** (2012) The role of AKT1 and autophagy in the protective effect of hydrogen sulphide against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Autophagy* **8**: 954-962
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ y Olsen RW** (1999) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397**: 69-72
- Wang R** (2012) Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* **92**: 791-896
- Wang R** (2014) Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem Sci* **39**: 227-232
- Wang W, Xu B, Wang H, Li J, Huang H y Xu L** (2011) YUCCA genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. *Plant Physiology* **157**: 1805-1819

- Wang Y, Li L, Cui W, Xu S, Shen W y Wang R** (2011) Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant and Soil* **351**: 107-119
- Watanabe M, Kusano M, Oikawa A, Fukushima A, Noji M y Saito K** (2008a) Physiological roles of the beta-substituted alanine synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **146**: 310-320
- Watanabe M, Mochida K, Kato T, Tabata S, Yoshimoto N, Noji M y Saito K** (2008b) Comparative genomics and reverse genetics analysis reveal indispensable functions of the serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 2484-2496
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V y Elazar Z** (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *Embo J* **29**: 1792-1802
- Welters P, Takegawa K, Emr SD y Chrispeels MJ** (1994) AtVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 11398-11402
- White BJ** (2012) The vascular effects of hydrogen sulphide. University of Nottingham
- Wienkoop S, Zoeller D, Ebert B, Simon-Rosin U, Fisahn J, Glinski M y Weckwerth W** (2004) Cell-specific protein profiling in *Arabidopsis thaliana* trichomes: identification of trichome-located proteins involved in sulfur metabolism and detoxification. *Phytochemistry* **65**: 1641-1649
- Wirtz M, Berkowitz O, Droux M y Hell R** (2001) The cysteine synthase complex from plants. *European Journal of Biochemistry* **268**: 686-693
- Wirtz M, Droux M y Hell R** (2004) O-acetylserine (thiol) lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **55**: 1785-1798
- Wirtz M y Hell R** (2006) Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *J Plant Physiol* **163**: 273-286
- Wittstock U y Halkier BA** (2002) Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends Plant Sci* **7**: 263-270
- Woo HR, Kim JH, Kim J, Kim J, Lee U, Song I-J, Kim J-H, Lee H-Y, Nam HG y Lim PO** (2010) The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **61**: 3947-3957
- Woo J, Park E y Dinesh-Kumar SP** (2014) Differential processing of *Arabidopsis* ubiquitin-like Atg8 autophagy proteins by Atg4 cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 863-868
- Wu YC, Wang XJ, Yu L, Chan FK, Cheng AS, Yu J, Sung JJ, Wu WK y Cho CH** (2012) Hydrogen sulfide lowers proliferation and induces protective autophagy in colon epithelial cells. *PLoS One* **7**: 29
- Wullschleger S, Loewith R y Hall MN** (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484
- Xie Y, Lai D, Mao Y, Zhang W, Shen W y Guan R** (2013) Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a novel gene encoding L-cysteine desulphydrase from *Brassica napus*. *Mol Biotechnol* **54**: 737-746
- Xie Z y Klionsky DJ** (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**: 1102-1109
- Xiong Y, Contento AL y Bassham DC** (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **42**: 535-546

- Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ y Bassham DC** (2007a) Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiol* **143**: 291-299
- Xu S, Liu Z y Liu P** (2014) Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. *Int J Cardiol* **172**: 313-317
- Xuan W, Zhu FY, Xu S, Huang BK, Ling TF, Qi JY, Ye MB y Shen WB** (2008) The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process. *Plant Physiol* **148**: 881-893
- Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K** (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**: 251-264
- Yamaguchi Y, Nakamura T, Kusano T y Sano H** (2000) Three Arabidopsis genes encoding proteins with differential activities for cysteine synthase and beta-cyanoalanine synthase. *Plant Cell Physiol* **41**: 465-476
- Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kondo-Kakuta C, Ichikawa R, Kinjo M y Ohsumi Y** (2012) Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J Cell Biol* **198**: 219-233
- Yang G, Zhao K, Ju Y, Mani S, Cao Q, Puukila S, Khaper N, Wu L y Wang R** (2013) Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2. *Antioxidants & redox signaling* **18**: 1906-1919
- Yang W, Yang G, Jia X, Wu L y Wang R** (2005) Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *The Journal of physiology* **569**: 519-531
- Yano K, Suzuki T y Moriyasu Y** (2007) Constitutive autophagy in plant root cells. *Autophagy* **3**: 360-362
- Yeh Y-Y, Wrasman K y Herman PK** (2010) Autophosphorylation within the Atg1 activation loop is required for both kinase activity and the induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **185**: 871-882
- Yi C, Ma M, Ran L, Zheng J, Tong J, Zhu J, Ma C, Sun Y, Zhang S y Feng W** (2012) Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science* **336**: 474-477
- Yi H, Galant A, Ravilious GE, Preuss ML y Jez JM** (2010) Sensing sulfur conditions: simple to complex protein regulatory mechanisms in plant thiol metabolism. *Mol Plant* **3**: 269-279
- Yoshida S** (2003) Molecular regulation of leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 79-84
- Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T y Ohsumi Y** (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* **16**: 2967-2983
- Yoshimoto K, Jikumar Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y y Shirasu K** (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2914-2927
- Yoshimoto K, Takano Y y Sakai Y** (2010) Autophagy in plants and phytopathogens. *FEBS Lett* **584**: 1350-1358
- Yoshimoto N, Inoue E, Saito K, Yamaya T y Takahashi H** (2003) Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1;3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in Arabidopsis. *Plant Physiol* **131**: 1511-1517

- Yoshimoto N, Takahashi H, Smith FW, Yamaya T y Saito K** (2002) Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *Plant J* **29**: 465-473
- You Z, Cao X, Taylor AB, Hart PJ y Levine RL** (2010) Characterization of a Covalent Polysulfane Bridge in Copper– Zinc Superoxide Dismutase. *Biochemistry* **49**: 1191-1198
- Young AR, Chan EY, Hu XW, Köchl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J y Tooze SA** (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of cell science* **119**: 3888-3900
- Zhang D, Macinkovic I, Devarie-Baez NO, Pan J, Park C-M, Carroll KS, Filipovic MR y Xian M** (2014) Detection of Protein S-Sulphydration by a Tag-Switch Technique. *Angewandte Chemie International Edition* **53**: 575-581
- Zhang H, Hu LY, Hu KD, He YD, Wang SH y Luo JP** (2008) Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *J Integr Plant Biol* **50**: 1518-1529
- Zhang H, Hu S-L, Zhang Z-J, Hu L-Y, Jiang C-X, Wei Z-J, Liu J, Wang H-L y Jiang S-T** (2011) Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. *Postharvest Biology and Technology* **60**: 251-257
- Zhang H, Tan ZQ, Hu LY, Wang SH, Luo JP y Jones RL** (2010) Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *J Integr Plant Biol* **52**: 556-567
- Zhang H, Tang J, Liu XP, Wang Y, Yu W, Peng WY, Fang F, Ma DF, Wei ZJ y Hu LY** (2009) Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *J Integr Plant Biol* **51**: 1086-1094
- Zheng L, White RH, Cash VL, Jack RF y Dean DR** (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2754-2758

